

# **Die Rolle der Extrazellulärdomäne beim agonistenabhängigen und agonistenunabhängigen Aktivierungsprozess des LH-Rezeptors**



Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
  
dem  
Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
  
**Pascal Nurwakagari**  
**aus Neuss**

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
8. März 2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann  
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie  
Philipps-Universität, Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Gudermann  
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2011

Für meine Mutter Karin



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Übertragung endokriner Signale durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.2	Der LH-Rezeptor und seine Liganden als Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse .....	1
1.3	Mutationen des LHR als Ursache für pathophysiologische Veränderungen .....	3
1.3.1	Hypogonadismus und Leydigzell-Hypoplasie durch inaktivierende Rezeptormutationen.....	4
1.3.2	Pubertas praecox durch aktivierende Rezeptormutationen .....	4
1.4	Struktur und Topologie des LHR und verwandter Rezeptoren .....	6
1.5	Struktur der natürlichen Liganden des LHR und seiner Verwandten .....	11
1.6	Signaltransduktion über Glykoproteinhormon-Rezeptoren .....	12
1.7	Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung.....	12
1.8	Fragestellung .....	17
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	19
2.1.1	Standardchemikalien und –reagenzien.....	19
2.1.2	Antibiotika.....	19
2.1.3	Antikörper.....	19
2.1.4	Enzyme, Kits und Größenstandards .....	20
2.1.5	Hormone .....	20
2.1.6	Radioaktive Substanzen .....	21
2.1.7	Plasmide .....	21
2.1.8	Primer.....	22
2.2	Bakterien .....	24
2.3	Zellkultur.....	24
2.3.1	Zelllinien .....	24
2.3.2	Medien für die Zellkultur.....	25
2.4	Geräte .....	25
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmid-DNA .....	27
3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	27

---

3.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> durch Hitzschock.....	28
3.1.3	Isolierung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation).....	28
3.1.4	Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midipräparation).....	29
3.1.5	DNA-Isolierung durch Phenol-Chloroform-Extraktion .....	30
3.1.6	DNA-Aufreinigung durch Ethanolfällung .....	30
3.1.7	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	31
3.2	Modifikation von Nukleinsäuren .....	32
3.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	32
3.2.1.1	Ortsgerichtete <i>in vitro</i> -PCR-Mutagenese mittels QuikChange®-Kit.....	32
3.2.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme .....	33
3.2.3	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden.....	34
3.2.4	Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden.....	34
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
3.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	35
3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
3.3	Methoden der eukaryontischen Zellkultur .....	37
3.3.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	37
3.3.2	Kryokonservierung kultivierter Zellen .....	37
3.3.3	Transiente Transfektion .....	38
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.4.1	Lyse kultivierter COS7-Zellen zur Untersuchung in Western-Blot- Analysen .....	38
3.4.2	Gesamtmembranpräparation von transfizierten COS7-Zellen .....	39
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	40
3.4.4	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE .....	40
3.4.5	Western-Blot-Analyse und Immundetektion.....	42
3.4.6	Zelloberflächenexpressions-ELISA .....	43
3.4.7	Immunfluoreszenz-Studien .....	45
3.4.8	cAMP-Akkumulationsassay.....	47
<b>4</b>	<b>Versuchsergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	Erniedrigung der Rezeptoraktivität des LHR durch Entfernen oder Verkürzung der Extrazellulärdomäne.....	50
4.2	Funktionelle Charakterisierung von Hormon-Rezeptor- Fusionsproteinen.....	56

---

4.3	Verlust der Signaltransduktionseigenschaften von Hormon-Rezeptor-Varianten nach Deletion von LRR.....	64
4.4	Funktionelle Charakterisierung von LHR-Varianten mit unterschiedlichen Extrazellulärdomänen .....	69
4.5	Minderung der Wirkung von aktivierenden LHR-Mutationen bei Deletion von LRR .....	78
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>81</b>
5.1	Die Extrazellulärdomäne stellt keinen intramolekularen inversen Agonisten dar .....	81
5.2	Eine intakte Extrazellulärdomäne ist für eine agonisteninduzierte Rezeptoraktivität notwendig .....	84
5.3	Die LRR der Extrazellulärdomäne unterstützen eine aktive Rezeptorkonformation .....	87
5.4	Die intakte native Extrazellulärdomäne ist für eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung notwendig .....	90
5.5	Abschließendes Rezeptormodell für den LHR .....	96
5.6	Ausblick .....	99
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>129</b>
<b>13</b>	<b>Publikationen und Vorträge .....</b>	<b>131</b>
13.1	Publikationen.....	131
13.2	Vorträge .....	131
<b>14</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>132</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Übertragung endokriner Signale durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Vermittlung endokriner Signale, die lebensnotwendige Funktionen von Zellen, Organen oder ganzen Organismen beeinflussen, kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Ein Weg, Signale in die Zelle weiterzuleiten, führt über membranständige Rezeptoren. Die weitaus größte Gruppe innerhalb der membranständigen Rezeptoren stellt die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar (Wess, 1997). Dieser Gruppe gehört auch der Rezeptor für die Glykoproteinhormone luteinisierendes Hormon (LH, Lutropin) und Choriongonadotropin (CG), der LH-Rezeptor (LHR) an. Enge strukturelle Verwandten des LHR stellen die Rezeptoren für das follikel-stimulierende Hormon (FSH, Folitropin) und das thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH, Thyreotropin) dar, die als FSH- bzw. TSH-Rezeptor bezeichnet werden (Dufau, 1998). Zusammen bilden die genannten Rezeptoren die Gruppe der Glykoproteinhormon-Rezeptoren.

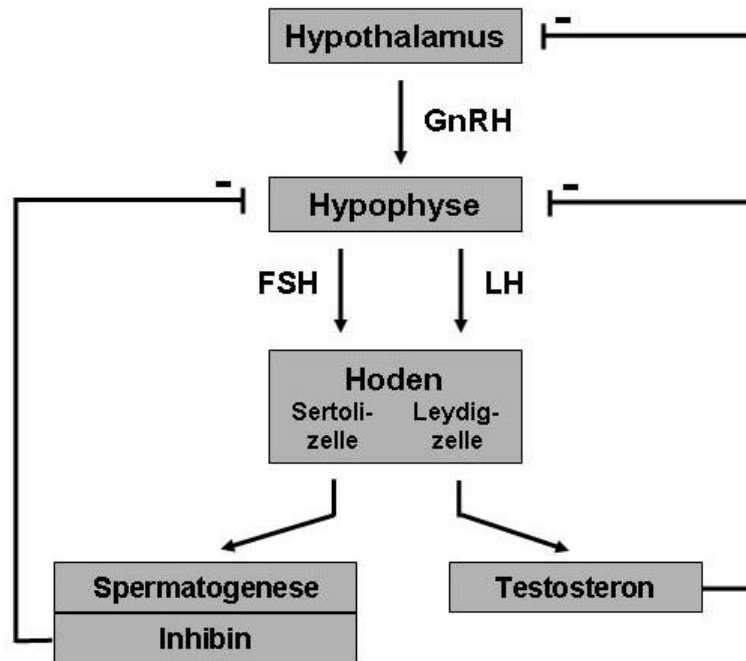
Die Superfamilie der GPCR umfasst Rezeptoren für eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden, die von Aminosäuren und Aminen über Calciumionen und Licht-Photonen bis hin zu Riechstoffen und Pheromonen reicht (Schwartz et al., 2006). Eine Signalweiterleitung über GPCR erfolgt in der Regel durch spezifische Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren. Dieser Prozess bewirkt eine Konformationsänderung der Rezeptoren, worauf eine Aktivierung von G-Proteinen erfolgt (Wess, 1997). Über nachgeschaltete Reaktionen ist am Ende der Signaltransduktionskaskade eine Veränderung von intrazellulären Signalmolekül-Konzentrationen zu verzeichnen, die die Funktion der jeweiligen Zelle beeinflussen.

## 1.2 Der LH-Rezeptor und seine Liganden als Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Die Glykoproteinhormone LH und CG spielen neben FSH eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Wachstums und der Funktion der Gonaden. Ihre Wirkung vermitteln sie über ihre Rezeptoren, den LH-Rezeptor (LHR) und FSH-Rezeptor (FSHR). Sie sind Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, einem Regelkreis, der nach dem sog. „negativen Feedback“-Mechanismus funktioniert. In



diesem Regelkreis erfolgt physiologisch eine Istwert-Sollwert-Anpassung der Signalbotenstoffe, die für eine Funktion der Gonaden sorgt (Abb. 1.2.1).



**Abb. 1.2.1. „Negativer Feedback“-Mechanismus am Beispiel der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse des Mannes.**

In diesem Regelkreis wird zunächst das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) aus dem Hypothalamus sezerniert, welches an der Hypophyse die Freisetzung der Gonadotropine FSH und LH stimuliert. Insbesondere an den Gonaden entfalten FSH und LH ihre Wirkung, wobei beim Mann speziell FSH die Spermatogenese in den Sertolizellen fördert und LH die Androgen-Produktion in den Leydigzellen des Hodens anregt. Innerhalb dieses Systems erfolgt eine Istwert-Sollwert-Anpassung. Ein zu hoher Testosteron-Spiegel im Blut wird vom Hypothalamus und der Hypophyse registriert, die daraufhin weniger GnRH bzw. Gonadotropine freisetzen. Innerhalb der Istwert-Sollwert-Anpassung von FSH spielt ein weiteres Hormon eine wichtige Rolle, und zwar Inhibin. Inhibin wird von den Sertolizellen des Hodens gebildet und bewirkt an der Hypophyse eine Drosselung der FSH-Freisetzung.

Über Freisetzung des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH, Gonadoliberin) aus dem Hypothalamus wird die Produktion der Gonadotropine LH und FSH in der Adrenohypophyse reguliert. Während des ersten Drittels der Schwangerschaft bildet die Plazenta ein weiteres Glykoproteinhormon, und zwar das Choriogonadotropin (CG). CG ist für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und die Versorgung des Embryos notwendig ist. Es stellt neben LH einen Liganden des LHR dar, weshalb dieser auch als CG/LH-Rezeptor bezeichnet wird. Über den Blutkreislauf gelangen die Gonadotropine zu den Zielorganen.

Beim Mann fördert LH im Hoden über Stimulation des LHR die Bildung von Testosteron in den Leydigzellen (Rommerts and Brinkman, 1981; Themmen and Huhtaniemi, 2000; Haider, 2004). Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass während der Schwangerschaft auch mütterliches CG die Testosteron-Produktion im männlichen Fötus anregt und auf diese Weise die Ausbildung der primären Geschlechtsmerkmale im Fötus bewirkt (Huhtaniemi et al., 1977). Bei der Frau regt LH in den Thekazellen die Produktion von Testosteron an, welches als Substrat für die Östrogen-Synthese in den Granulosazellen dient. Im Ovar löst LH den Eisprung aus, danach dient es zur Aufrechterhaltung der Progesteron-Produktion im Corpus Luteum (Themmen and Huhtaniemi, 2000).

Die Wechselwirkung des FSH mit dem FSHR bewirkt bei der Frau die Follikel-Reifung und die Differenzierung der Granulosazellen (Richards, 1994). Beim Mann entfaltet FSH seine Wirkung hauptsächlich an den Sertolizellen des Hodens. Dort ist es für die Proliferation dieser Zellen im unreifen Hoden und schließlich für die Spermatogenese im reifen Hoden zuständig. Neben der Wirkung auf die Gonaden sind für LH, hCG und FSH auch Wirkungen auf andere Organe („extragonadal effects“) beschrieben worden. So wurden CG/LH-vermittelte Effekte und LHR-Expressionen u. a. im Uterus (Reshef et al., 1990) und auch im Gehirn (Bowen et al., 2002) beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass LH sowie der LHR im Gehirn identifiziert werden konnten und LH eine regulatorische Funktion bei der Amyloid $\beta$ -Ablagerung spielen könnte, wird eine mögliche Rolle von LH und dem LHR bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit diskutiert (Bowen et al., 2004; Webber et al., 2005; Barron et al., 2006).

### **1.3 Mutationen des LHR als Ursache für pathophysiologische Veränderungen**

Ein intakter LHR ist neben dem FSHR eine Voraussetzung für eine normale Geschlechtsdifferenzierung und eine adäquate Funktion der Gonaden. Mutationen des LHR können daher zu massiven Störungen innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse führen. Je nach Art der Mutation und des Geschlechts können sich die Störungen in unterschiedlichen Krankheitsbildern äußern. Im Folgenden wird auf Erkrankungen eingegangen, die auf aktivierende oder inaktivierende Mutationen des LHR zurückzuführen sind.

### **1.3.1 Hypogonadismus und Leydigzell-Hypoplasie durch inaktivierende Rezeptormutationen**

Inaktivierende Mutationen resultieren in einer gestörten Hormonbindefähigkeit und/oder in verminderten Signaltransduktionseigenschaften des LHR. Im Mann sind sie daher mit einer eingeschränkten Testosteronbiosynthese in Leydigzellen verbunden. Klinisch entwickelt sich eine Leydigzell-Hypoplasie (LCH) und aufgrund des fehlenden Feedbacks des Testosterons innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ein hypergonadotroper Hypogonadismus. Je nach Grad der Inaktivierung des LHR und der damit verbundenen verminderten Testosteronproduktion unterscheidet man zwei Formen der LCH (Themmen et al., 1998). Bei der schweren Form der LCH (LCH Typ-1) führt eine vollständige Inaktivierung des LHR zur Ausbildung von weiblichen Geschlechtsmerkmalen bei einem männlichen Karyotyp (46, XY). Man spricht daher von einem ausgeprägten Pseudohermaphroditismus masculinus. Bei der leichten Form der LCH (LCH Typ-2) ist der LHR nur partiell inaktiviert, sodass eine eingeschränkte Testosteronsynthese erfolgt. Für diese Form der LCH sind bei Jungen sowie Männern ein Mikropenis, Hypospadie oder intersexuelle Genitale beschrieben worden (Misrahi et al., 1997; Martens et al., 1998; Richter-Unruh et al., 2002). Bei der Frau äußern sich inaktivierende LHR-Mutationen in der Regel in einer primären Amenorrhö oder Infertilität, wobei die primären und sekundären Geschlechtsmerkmale normal ausgebildet sein können (Toledo et al., 1996; Themmen & Huhtaniemi, 2000). Eine Übersicht der natürlich vorkommenden inaktivierenden LHR-Mutationen ist in Tab. 1.3 abgebildet.

Da bei einigen Patienten mit klassischen Symptomen einer LCH bisher keine inaktivierenden LHR-Mutationen identifiziert werden konnten, wird vermutet, dass Mutationen in Introns oder Promotorregionen ebenfalls Ursache einer LCH sein können (Zenteno et al., 1999; Richter-Unruh, Martens et al., 2002; Kossack et al., 2008).

### **1.3.2 Pubertas praecox durch aktivierende Rezeptormutationen**

Das Krankheitsbild der Pubertas praecox ist durch einen Eintritt der Pubertät bei Mädchen vor dem achten und bei Jungen vor dem neunten Lebensjahr gekennzeichnet. Nach einer kürzlich durchgeführten Untersuchung liegt die Inzidenz der Erkrankung in Süddeutschland bei 2,42 pro 100.000 Menschen und Jahr und die Prävalenz bei ca. 11 Betroffenen pro 100.000 Einwohner (Schweizer et al., 2010).

Pubertas praecox kann unterschiedliche Ursachen haben. Neben einer verfrühten Aktivierung der hypothalamo-hypophysären Achse (gonadotropinabhängiger Pubertas praecox), Mutationen im G-Protein  $G\alpha_s$  (McCune-Albright Syndrom) oder einer Dysfunktion der Nebennierenrinde (adrenogenitales Syndrom) sind aktivierende Mutationen im LHR eine häufige Ursache von Pubertas praecox (Themmen & Huhtaniemi, 2000; Ashley et al., 2007; Diaz et al., 2007).

Untersuchungen an Patienten, bei denen eine durch Mutationen im LHR bedingte Pubertas praecox auftrat, ergaben, dass ausschließlich Männer von dieser Erkrankung betroffen sind und die Erkrankung meist erblich bedingt ist. Sie wird daher auch als „familial male-limited precocious puberty“ (FMPP) bezeichnet.

**Tab. 1.3. Dokumentierte natürlich vorkommende aktivierende und inaktivierende Mutationen des humanen LH-Rezeptors.**

In der Tabelle angegeben sind Art des Aminosäureaustausches bzw. der Modifikation, welche der jeweiligen aktivierenden oder inaktivierenden Mutation zugrunde liegt, sowie Publikationen zur erstmaligen Dokumentation der einzelnen Mutation. Neben Publikationen, in denen die jeweilige Mutation erstmalig beschrieben wurde, sind in manchen Fällen weitere wichtige Publikationen aufgeführt. Aminosäureaustausche sind im Einbuchstaben-Code angegeben. nt, Nukleotid;  $\Delta$ , Deletion; fs, Frameshift.

	<b>Modifikation/ Aminosäureaustausch</b>	<b>Publikationen</b>
<b><i>Inaktivierende Mutationen:</i></b>	Insertion von 33 nt nach 54. nt I114F C133R V144F I152T F194V $\Delta$ Exon 8 $\Delta$ Exon 10 $\Delta$ Y317-S342 C343S E354K W491X C543R C545X R554X A593P $\Delta$ L608V609 S616Y I625K nt-Austausch an Pos. 537-3 Frameshift-Mutation durch Insertion eines nt in Exon 11 (Codon A589fs) nt-Austausch an Pos. 557 bzw. 558 in Exons 6A	Wu et al., 1998 Leung et al., 2006 Misrahi et al., 1997 Richter-Unruh et al., 2004 Qiao et al., 2009 Gromoll et al., 2002 Laue et al., 1996 (a) Gromoll et al., 2000 Bruysters et al., 2008 Martens et al., 2002 Stavrou et al., 1998 Richter-Unruh et al., 2002 Martens et al., 2002 Laue et al., 1995 (b) Latronico et al., 1996 Kremer et al., 1995; Toledo et al., 1996 Latronico et al., 1998 (b) Latronico et al., 1996 Martens et al., 1998 Qiao et al., 2009 Richter-Unruh et al., 2005 Kossack et al., 2008

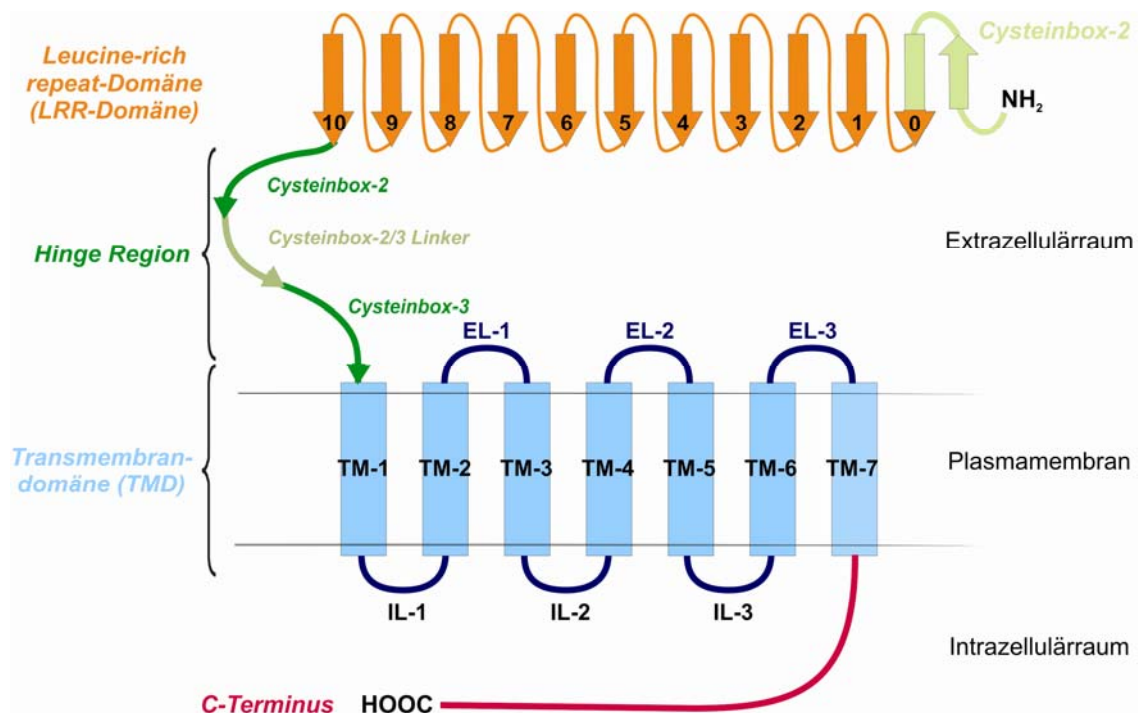
**Tab. 1.3. Dokumentierte natürlich vorkommende aktivierende und inaktivierende Mutationen des humanen LH-Rezeptors (Fortsetzung).**

	<b>Modifikation/ Aminosäureaustausch</b>	<b>Publikationen</b>
<b>Aktivierende Mutationen:</b>	A373V	Gromoll et al., 1998
	M398T	Kraaij et al., 1995; Laue et al., 1995 (a); Evans et al., 1996; Yano, Kohn et al., 1996
	L457R	Latronico et al., 1998 (a)
	I542L	Laue et al., 1995 (a)
	D564G	Laue et al., 1995 (a); Kremer et al., 1999
	A568V	Latronico et al., 1995
	M571I	Kremer et al., 1993; Kosugi et al., 1995
	A572V	Yano et al., 1995
	I575L	Laue et al., 1996 (a)
	T577I	Kosugi et al., 1995; Cocco et al., 1996
	D578G	Kremer et al., 1993; Shenker et al., 1993; Yano et al., 1994
	D578H	Liu et al., 1999
	D578E	Wu et al., 1999
	D578Y	Laue et al., 1995 (a); Muller et al., 1998
	C581R	Laue et al., 1995 (a)

## 1.4 Struktur und Topologie des LHR und verwandter Rezeptoren

GPCR, zu denen der LHR und die übrigen Glykoprotein-hormon-Rezeptoren zählen, zeichnen sich durch eine identische Grundstruktur aus. Diese Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranären Helices, die jeweils aus 20 bis 35 Aminosäuren aufgebaut sind (Palczewski et al., 2000). Über drei Intrazellulär- und drei Extrazellulärschleifen sind diese Transmembranhelices miteinander verbunden (siehe Abb. 1.4.1). Die Transmembranhelices zusammen mit den Intrazellulär- und Extrazellulärschleifen werden als Transmembrandomäne (TMD) bezeichnet. Der aminoterminal Teil der Rezeptoren ragt in den Extrazellulärraum, weshalb dieser Teil auch als Extrazellulärdomäne (EZD) bezeichnet wird. Der C-Terminus befindet sich im Intrazellulärraum.

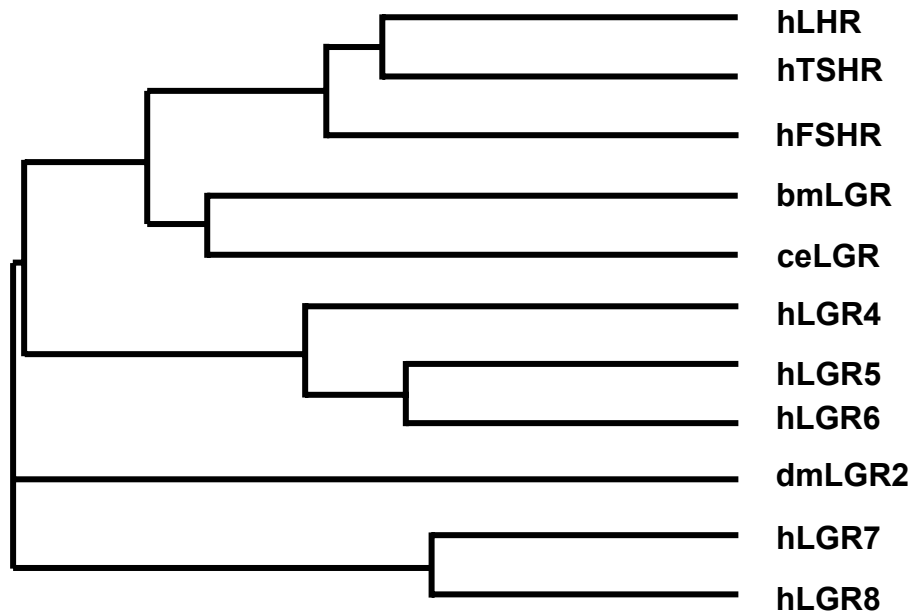
GPCR können in mehrere Subfamilien unterteilt werden (Kolakowski, 1994; Fredriksson et al., 2003). Der Großteil der GPCR kann der Subfamilie A, den rhodopsinähnlichen Rezeptoren, zugeordnet werden. Der LH-Rezeptor und die übrigen Glykoprotein-hormon-Rezeptoren stellen ebenfalls Mitglieder dieser Subfamilie dar, wobei sie im Gegensatz zu den meisten Vertretern dieser Familie über eine lange EZD verfügen. Ein strukturelles Merkmal der langen EZD des LHR und verwandter



**Abb. 1.4.1. Schematische Darstellung eines Glykoproteinrezeptors.**

Glykoproteinrezeptoren können in eine Extrazellulärdomäne (EZD), eine Transmembrandomäne sowie einen C-Terminus unterteilt werden. Die EZD ist in Cysteinebox-1, LRR-Domäne und Hinge Region untergliedert, wobei Cysteinebox-1 zur LRR-Domäne gezählt werden kann. Nach Fan und Hendrickson enthält die EZD elf LRR, wobei im C-terminalen Bereich der Cysteinebox-1 ein zusätzlicher LRR lokalisiert ist. Die Hinge Region besteht aus Cysteinebox-2 und Cysteinebox-3, die über den Cysteinebox-2/3 Linker verbunden sind. Die TMD ist aus sieben Transmembranhelices (TMD-1 bis -7) aufgebaut, die über drei Intra- und drei Extrazellulärschleifen miteinander verbunden sind. Der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert.

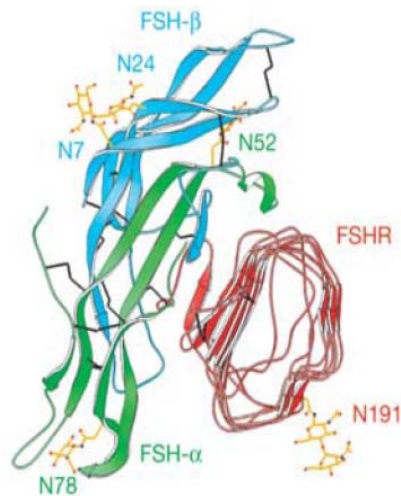
Rezeptoren ist die Existenz von kurzen, repetitiven Strukturmotiven, die sehr viele Leucinreste enthalten und daher als *Leucine-rich Repeats* (LRR) bezeichnet werden (siehe Abb. 1.4.1). Die meisten LRR enthalten 20 bis 30 Aminosäuren und zeichnen sich durch das Strukturmotiv LxxLxLxx(N/C)xL ( $x = L, V, I$  oder  $F$ ) aus (Enkhbayar et al., 2004). Zusammen mit anderen GPCR, die ebenfalls über LRR verfügen, bildet der LHR die Subfamilie der „leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors“ (LGR) (Hsu et al., 2000; Ascoli et al., 2002; Herpin et al., 2004). In Abb. 1.4.2. sind die Verwandtschaftsgrade verschiedener LGR in Form eines phylogenetischen Stammbaums dargestellt. Über Kristallisation des Schweine-Ribonuklease-Inhibitors (Kobe & Deisenhofer, 1993), einem Protein, das ebenfalls LRR enthält, sowie des Ribonuklease-Inhibitors zusammen mit seinem Bindepartner (Kobe & Deisenhofer,



**Abb. 1.4.2. Phylogenetischer Stammbaum der LGR hinsichtlich der EZD.**

Aminosäuresequenzen von LGR, die mit Glykoproteinormon-Rezeptoren näher verwandt sind, sind über das Genom-Programm der „UCSC Genome Bioinformatics“-Internetseite (<http://genome.ucsc.edu>) ermittelt worden. Zur Identifizierung der kompletten Aminosäuresequenz der EZD jedes einzelnen LGR-Vertreters sind Sequenzvergleiche mittels des Programms MEGALIGN von DNASTAR sowie CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt worden. Die ermittelten Aminosäuresequenzen wurden anschließend mittels des MEGALIGN-Programms miteinander verglichen. Der phylogenetische Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der humanen Glykoproteinormon-Rezeptoren (hLHR, hFSHR, hTSHR), anderer humaner LGR (z. B. hLGR7) sowie der LGR des Seidenspinners (*Bombyx mori*; bmLGR), des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*; ceLGR) und von *Drosophila melanogaster* (dmLGR2) auf.

1995) konnte ein erstes Modell der 3D-Struktur der LRR erstellt werden. Die Kristallstruktur des Schweine-Ribonuklease-Inhibitors zeigte, dass LRR haarnadelähnliche Motive bilden, die aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und einer  $\alpha$ -Helix aufgebaut sind. Nach diesem Modell formen alle LRR zusammen eine hufeneisenförmige Struktur. Das Modell des Schweine-Ribonuklease-Inhibitors bildete die Grundlage zur Erstellung von Strukturmodellen der LRR-Domäne der Glykoproteinormon-Rezeptoren (Jiang et al., 1995; Moyle et al., 1995; Bhowmick et al., 1996). 2005 konnten Fan & Hendrickson erfolgreich den Komplex aus dem Glykoproteinormon hFSH und LRR-Domäne sowie *Cysteinbox-1* des hFSHR kristallisieren (Fan & Hendrickson, 2005 (a)(b)) (Abb. 1.4.3). Anhand dieser



**Abb. 1.4.3. Die Kristallstruktur des Komplexes aus hormonbindendem Bereich der EZD des hFSHR und hFSH (Fan & Hendrickson, 2005 (a); Abb. 3C; Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags Springer Science and Business Media).**

Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur des Komplexes aus N-terminaler, hormonbindender EZD des hFSHR zusammen mit dem kovalent gebundenen hFSH. Die LRR-Domäne des FSHR, von Fan und Hendrickson Hormonbindedomäne (FSHR<sub>HB</sub>) genannt, ist in rot dargestellt. In dem Modell stellt das C-terminale Ende der *Cysteinbox-1* bereits den ersten LRR dar. Die  $\alpha$ -Untereinheit des hFSH (FSH $\alpha$ ) ist grün, die  $\beta$ -Untereinheit des hFSH (FSH $\beta$ ) hellblau markiert. Disulfidbrücken sind als schwarze Linien dargestellt. N-Glykosylierungen (gelb) mit entsprechender Angabe der Aminosäureposition in der EZD bzw. den Hormonuntereinheiten (z. B. N24) sind eingezeichnet.

Kristallstruktur konnten sie wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Art der Hormon-Rezeptor-Interaktion und der Anordnung von Glykoproteinhormonen zur LRR-Domäne ihrer Rezeptoren gewinnen (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Beispielsweise konnten sie zeigen, dass die LRR-Domäne der FSHR-EZD waagerecht angeordnet ist und das zu ihr senkrecht stehende FSH in einer Art „Handschlag“-Formation umfasst (Abb. 1.4.3). Darüber hinaus zeigt das 3D-Modell der Kristallstruktur, dass der Radius des durch die LRR gebildeten Bogens kleiner als angenommen ist. Aufgrund des nahen Verwandtschaftsgrades vom LH-Rezeptor zum FSHR in Bezug auf die Aminosäuresequenz (Vassart et al., 2004) geht man davon aus, dass der LHR mit seinem Liganden eine ähnliche Formation wie die für FSHR und Hormon beschriebene bildet. Da Fan & Hendrickson für ihre Untersuchungen nicht die komplette EZD des FSHR herangezogen haben, sondern ausschließlich die LRR-Domäne inklusive *Cysteinbox-1*, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass bei Vorhandensein der kompletten EZD eine etwas geänderte Hormon-EZD-Anordnung zustande kommt.

Hinsichtlich der Anzahl der LRR, die in der EZD des LHR und der übrigen Glykoproteinhormon-Rezeptoren lokalisiert sind, gibt es unterschiedliche Angaben. Sie



reichen von 8 bis 14 LRR, wobei die Annahme von 9 in der LHR-EZD lokalisierten LRR bisher die meiste Zustimmung fand (Ascoli et al., 2002; Puett et al., 2005). Wie das 3D-Modell von Fan & Hendrickson zeigt, scheint die EZD der Glykoproteinhormon-Rezeptoren vielmehr elf LRR zu enthalten, wobei der C-terminale Bereich der *Cysteinbox-1* einen zusätzlichen LRR formt (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Es ist beschrieben worden, dass LRR an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Insbesondere für die N-terminalen LRR ist in vielen Studien eine Beteiligung an der Hormonbindung beschrieben worden (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998). Dagegen sind in der Literatur widersprüchliche Daten hinsichtlich der Rolle der C-terminalen LRR bei der Hormonbindung zu finden (Braun et al., 1991; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998). Deutliche Hinweise dafür, dass mit Ausnahme des in der *Cysteinbox-1* lokalisierten LRR alle *Leucine-rich Repeats* des hFSHR an der Bindung des Hormons beteiligt sind, liefert das 3D-Modell von Fan und Hendrickson (Fan & Hendrickson, 2005 (b)).

Neben der LRR-Region ist in der EZD von Glykoproteinhormon-Rezeptoren die *Hinge Region* lokalisiert (siehe Abb. 1.4.1). Sie kann in *Cysteinbox-2*, *Cysteinbox-3* und den *Cysteinbox-2/3 Linker* unterteilt werden. Wie der Name erkennen lässt, wird angenommen, dass die *Hinge Region* als „Scharnier“ dient und die LRR-Region mit der TMD verbindet. In einigen Studien ist die Rolle der *Hinge Region* untersucht worden. Moyle et al. postulieren in ihrem Modell der Glykoproteinhormon-Rezeptoraktivierung, dass sie neben der LRR-Region an der Hormonbindung beteiligt ist (Moyle et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen können dagegen keine Hinweise für eine Hormonbindefunktion der *Hinge Region* finden (Zhang et al., 1996; Nakabayashi et al., 2000; Zeng et al., 2001). In einer kürzlich erschienen Studie zum TSH-Rezeptor konnten Aminosäuren in der *Hinge Region* identifiziert werden, die zur Hormonbindung beitragen und partiell die Rezeptoraktivität erhöhen (Mueller et al., 2008). Hinsichtlich des Einflusses der *Hinge Region* auf die Rezeptoraktivität des LHR sind widersprüchliche Daten publiziert worden. Während manche Arbeitsgruppen über eine *Hinge Region* des LHR berichten, welche die Transmembrandomäne über Kontaktpunkte in einem inaktiven Zustand hält (Nakabayashi et al., 2000; Zeng et al., 2001; Nishi et al., 2002), sprechen die Daten anderer Studien eher dafür, dass die *Hinge Region* eine ligandenvermittelte Rezeptoraktivierung unterstützt (Alvarez et al., 1999; Moyle et al., 2004).

Wie eingangs bereits erwähnt wurde, stellen die Transmembranhelices ein weiteres wichtiges strukturelles Merkmal des LHR und anderer GPCR dar. Sie sind

durch Extrazellulär- und Intrazellulärschleifen miteinander verbunden. Für einige Extrazellulärschleifen des LHR (z. B. EL-2 und EL-3) ist beschrieben worden, dass sie für die ligandenabhängige Rezeptoraktivierung notwendig sind (Fernandez & Puett, 1996; Ryu et al., 1996; Moyle et al., 2004). Die Intrazellulärschleifen IL-2 und IL-3 sollen an der G-Proteinkopplung beteiligt sein (Schulz et al., 1999; Ascoli et al., 2002; Angelova et al., 2008).

Einblicke in die Struktur der Transmembrandomäne von Rezeptoren der Subfamilie A konnten durch kristallographische Untersuchungen des Rhodopsins gewonnen werden (Palczewski et al., 2000; Okada et al., 2004), die oft als Grundlage für Computermodelle der TMD des LHR und anderer GPCR herangezogen werden. Kürzlich konnten weitere Vertreter dieser Rezeptorklasse, und zwar der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor sowie der  $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor, kristallisiert werden (Rasmussen et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Rosenbaum et al., 2009). Aufgrund des hohen Anteils an hydrophoben Aminosäuren in der TMD sowie anderer Faktoren ist es jedoch bisher nicht gelungen, einen kompletten Glykoproteinhormon-Rezeptor inklusive TMD zu kristallisieren.

## 1.5 Struktur der natürlichen Liganden des LHR und seiner Verwandten

Nicht nur der LHR und seine verwandten Rezeptoren, sondern auch die natürlichen Liganden dieser Rezeptoren, die Glykoproteinhormone, zeichnen sich durch eine Besonderheit aus. Sie stellen mit ihrem hohen Molekulargewicht von 28-38 kDa die größten Liganden für GPCR der Subfamilie A dar. Aufgrund dieser Tatsache erfolgt die Wechselwirkung zwischen Glykoproteinhormonen und ihren Rezeptoren größtenteils nach einem anderen Prinzip als die Bindung der meisten relativ kleinen Liganden an ihre GPCR dieser Subfamilie. Glykoproteinhormone binden an die EZD und lösen über eine Konformationsänderung ihrer Rezeptoren eine Signaltransduktionskaskade in der Zelle aus. Sie stellen Heterodimere dar, die aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind (Abb. 1.4..3). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sind länglich angeordnet, wobei beide Untereinheiten jeweils drei „Loops“ ( $\alpha$ -Untereinheit:  $\alpha L1$  bis  $\alpha L3$ ;  $\beta$ -Untereinheit:  $\beta L1$  bis  $\beta L3$ ) enthalten. Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist für alle Glykoproteinhormone identisch, die  $\beta$ -Untereinheit hingegen unterscheidet sich innerhalb der Glykoproteinhormone und ist für die spezifische Bindung an den jeweiligen Rezeptor verantwortlich (Themmen & Huhtaniemi, 2000). Innerhalb der

Glykoprotein hormone besteht eine geringe Affinität zu anderen Glykoprotein hormone-Rezeptoren. LH und CG sind bis auf Unterschiede im C-terminalen Bereich der  $\beta$ -Untereinheit im Wesentlichen identisch. CG ist im Vergleich zu LH im C-terminalen Teil der  $\beta$ -Untereinheit verlängert. 1994 konnte anhand der Kristallstruktur des hCG gezeigt werden, dass jede Hormonuntereinheit drei intramolekulare Disulfidbrücken enthält, die einen Cystein-Knoten bilden (Lapthorn et al., 1994).

## 1.6 Signaltransduktion über Glykoprotein hormone-Rezeptoren

Bereits vor der Klonierung des LHR und der übrigen Glykoprotein hormone-Rezeptoren waren einige „Second Messenger“ bekannt, die in die Signaltransduktion dieser Rezeptoren involviert sind. Beispielsweise konnte herausgefunden werden dass die Stimulation der Zielorgane (z. B. Hoden, Schilddrüse) bzw. Zielzellen (z. B. Leydigzellen) mit Glykoprotein hormonen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Gilman & Rall, 1968; Means, 1974; Dufau et al., 1977). Später konnte in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt werden, dass der LHR nach Hormonstimulation neben der Aktivierung der Adenylatzyklase auch den Signalweg über Phospholipase C anschaltet (Gudermann et al., 1992 (a); Gudermann et al., 1992 (b); Gilchrist et al., 1996; Kuhn & Gudermann, 1999; Hirakawa et al., 2002). Auch für den TSHR ist eine Signaltransduktion über Phospholipase C geschrieben worden (Laurent et al., 1987). An menschlichen Schilddrüsenmembranen wies man mittels Photoaffinitätsmarkierung nach, dass  $G_s$  und  $G_{q/11}$  an die aktive Form des TSHR koppelt (Allgeier et al., 1994), in späteren Untersuchungen konnte sogar eine Kopplung an  $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ , und  $G_{12/13}$  beobachtet werden (Laugwitz et al., 1996).

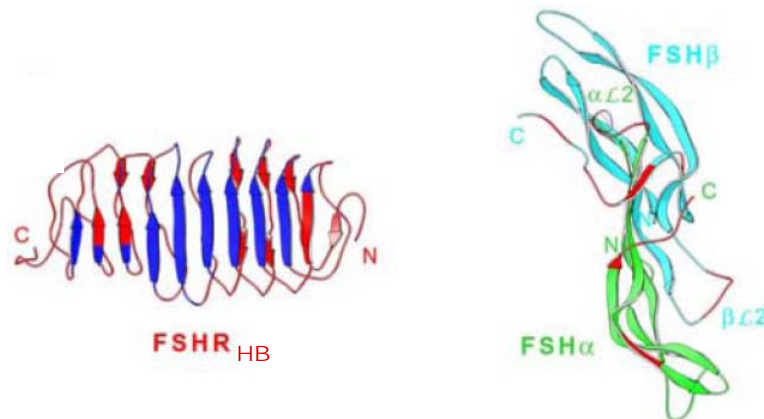
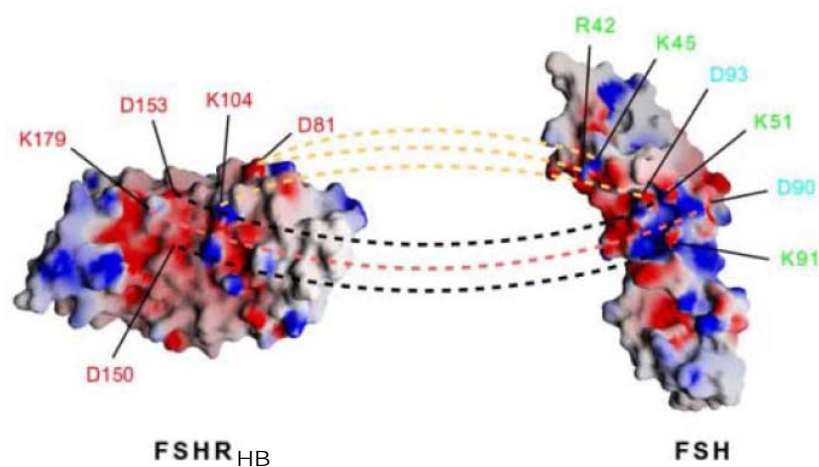
Für den LHR ist die Anschaltung eines weiteren Signalweges beschrieben worden, und zwar über die MAPK-Kaskade (Faure et al., 1994; Hirakawa et al., 2002). Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass eine durch anhaltende Hormonstimulation herbeigeführte Verminderung der Anzahl von LHR auf Zielzellen, ein als „Desensitisierung“ bezeichneter Prozess, auf eine Interaktion mit Proteinen der  $\beta$ -Arrestin-Familie zurückzuführen ist (Ascoli et al., 2002).

## 1.7 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Die Kristallstruktur des Komplexes aus LRR-Domäne des hFSR und angebundenem FSH lieferte wichtige Kenntnisse hinsichtlich der räumlichen

Anordnung eines Hormon-LRR-Komplexes sowie der an der Hormonbindung beteiligten Strukturen der LRR-Domäne von Glykoproteinhormon-Rezeptoren (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Nach diesem 3D-Modell der Kristallstruktur umfasst die LRR-Domäne des hFSHR den mittleren Bereich des Hormons, sodass eine Art „Handschlag“-Formation entsteht (Abb. 1.4.3). „Loop“  $\alpha$ L2 der Hormon- $\alpha$ -Untereinheit berührt den oberen Teil der „ $\beta$ -Strands“ von LRR 2 bis 6, „Loop“  $\beta$ L2 der Hormon- $\beta$ -Untereinheit interagiert mit Bereichen der Innenseite des LRR-Bogens, die LRR 8 bis 10 darstellen. Insgesamt gesehen, interagieren die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit mit allen LRR (Abb. 1.7.1A). Die „Loops“  $\beta$ L1 und  $\beta$ L3 überragen die senkrecht zu ihnen stehenden, C-terminalen Bereiche des LRR-Bogens,  $\alpha$ L1 und  $\alpha$ L3 ragen in die entgegengesetzte Richtung. Die Berührungsfläche zwischen LRR-Domäne und Hormonuntereinheiten ist im Vergleich zu anderen Proteinkomplexen durch eine vermehrte Ansammlung von geladenen Aminosäuren charakterisiert (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)), die eine entscheidende Rolle bei der Hormon-LRR-Interaktion spielen (Abb. 1.7.1B).

Trotz einer Vielzahl von Studien zu Glykoproteinhormon-Rezeptoren ist der exakte Ablauf der Rezeptoraktivierung bisher nicht eindeutig geklärt. Lediglich ist die Art und Weise der Hormonbindung weitestgehend aufgeklärt worden. Darüber hinaus ist bekannt, dass die TMD die Signaltransduktionskaskade über G-Proteine und andere Moleküle anschaltet (Ascoli et al., 2002). Über Mutageneseexperimente und Computersimulationsmodelle konnten einige Erkenntnisse bezüglich der Konformation der TMD und der Eigenschaft von aktivierenden TMD-Mutationen gewonnen werden. Hierbei ist für den hLHR gezeigt worden, dass aktive und inaktive Rezeptorzustände durch bestimmte Bindungen innerhalb der Transmembranhelices stabilisiert oder destabilisiert werden und dass relative Veränderungen der Anordnung der Transmembranhelices zueinander, z. B. ausgelöst durch Mutationen, einen Wechsel von aktiver zu inaktiver Konformation und umgekehrt hervorrufen können (Ascoli et al., 2002). Interaktionen von TMD-3 mit -6, TMD-3 mit -7 und TMD-6 mit -7 sollen den LHR beispielsweise in einem inaktiven Zustand arretieren (Fernandez & Puett, 1996; Angelova et al., 2000; Ascoli et al., 2002). Eine solche Interaktion erfolgt oft über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Helices. Untersuchungen von

**A****B**

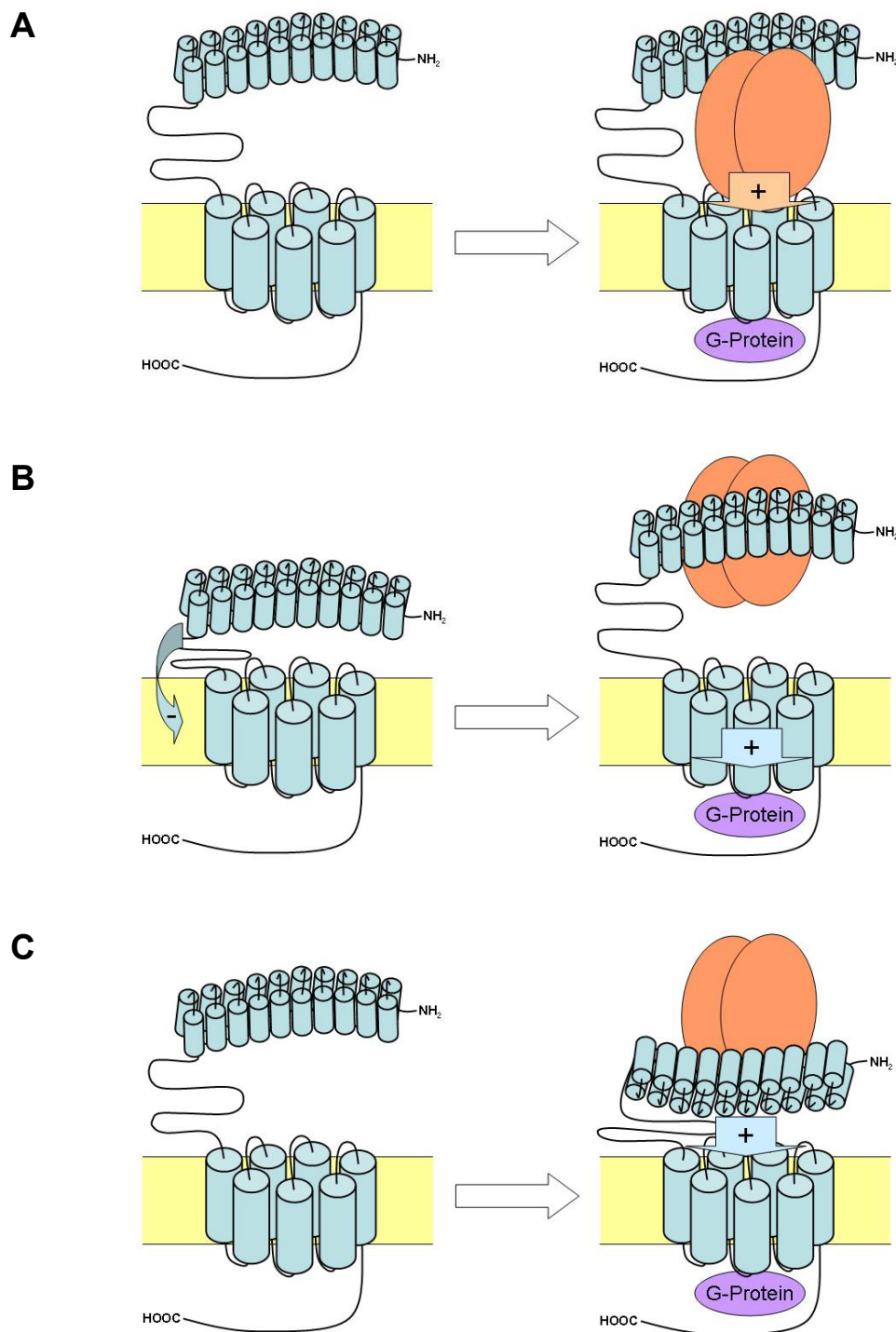
**Abb. 1.7.1. Analyse der Bindung von hFSH durch die LRR-Domäne des hFSHR (nach Fan & Hendrickson, 2005 (a): Abb. 4; Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags Springer Science and Business Media).**

A) „Ribbon“-Darstellung der LRR-Domäne des FSHR (FSHR<sub>HB</sub>; links) und des FSH (rechts). Die LRR-Domäne der FSHR ist in rot dargestellt, wobei an der Hormonbindung beteiligte Bereiche blau hervorgehoben sind. Die  $\alpha$ -Untereinheit des hFSH (FSH $\alpha$ ) ist grün, die  $\beta$ -Untereinheit des hFSH (FSH $\beta$ ) hellblau markiert. B) „Electrostatic surface potential“-Modell der LRR-Domäne des FSHR (FSHR<sub>HB</sub>; links) und des FSH (rechts). Gestrichelte Linien kennzeichnen wichtige Bindungen zwischen geladenen Aminosäuren (unter Positionsangabe) von Hormon und Rezeptor.

Kosugi et al. deuten darauf hin, dass beispielsweise eine Aspartat-Seitenkette an der Position 578 im hLHR als Wasserstoffbrückenakzeptor für eine Aminosäure in einer anderen TMD-Helix fungiert und eine inaktive LHR-Konformation unterstützt (Kosugi et al., 1996). Aktivierende Mutationen können nicht nur mit einem Bruch von Bindungen zwischen Transmembranhelices einhergehen, sondern auch zur Ausbildung von neuen Bindungen führen, die einen aktiven Rezeptorzustand stabilisieren. Ein Beispiel hierfür ist die Mutation L457R im hLHR, die eine Salzbrücke zwischen TMD-3 und -6 ermöglicht (Zhang et al., 2005).

Im Gegensatz zu den klaren Daten bezüglich der Rezeptorzustände, die durch aktivierende Mutationen induziert werden, ist der Mechanismus der hormoninduzierten Rezeptoraktivierung noch nicht eindeutig geklärt. Seit der Klonierung des LHR und der übrigen Glykoprotein-hormon-Rezeptoren sind einige Versuche unternommen worden, den exakten Mechanismus zu eruieren. Folgende Mechanismen bezüglich des Prozesses der Rezeptoraktivierung bei Glykoprotein-hormon-Rezeptoren werden postuliert:

1. Laut des ersten Modells erfolgt nach Bindung des Hormons an die EZD eine direkte Wechselwirkung des Hormons mit der TMD bzw. den Extrazellulärschleifen, die dazu führt, dass der Rezeptor mit G-Proteinen koppeln kann (Abb. 1.7.2A). Dieses Modell impliziert, dass nach Hormonbindung Strukturen des Hormons – höchst wahrscheinlich Bereiche in der für alle Glykoprotein-hormone identischen  $\alpha$ -Untereinheit – mit konservierten Aminosäuren der TMD des Rezeptors in Wechselwirkung treten. Das Ergebnis ist ein Anschalten der cAMP-Signaltransduktionskaskade. Unterstützt wird diese Theorie z. B. durch die Beobachtung, dass Antikörper, die gegen Bereiche der  $\alpha$ -Untereinheit des CG gerichtet sind, eine Rezeptoraktivierung verhindern können, aber keinen Einfluss auf die Bindung durch den Rezeptor haben (Couture et al., 1996).
2. In einem zweiten Modell (Abb. 1.7.2B), das insbesondere für den TSHR vorgeschlagen wird, hält die EZD des Rezeptors die Transmembranhelices in einem inaktiven Zustand. Er fungiert als intramolekularer inverser Agonist. Dieser hemmende Effekt der EZD auf die TMD kann durch Hormonbindung und aktivierende Mutationen unterbunden werden (Zhang et al., 1995; Van Sande et al., 1996; Grütters et al., 1998; Nakabayashi et al., 2000; Zhang et al., 2000; Nishi et al., 2002; Vlaeminck-Guillem et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesem Modell resultiert ein Entfernen der EZD in einer agonistenunabhängigen konstitutiven Aktivität des TSHR. Darüber hinaus induzieren partielles Entfernen von bestimmten Bereichen der EZD (Zhang et al., 1995) sowie aktivierende Mutationen innerhalb der EZD (Grütters et al., 1998; Nakabayashi et al., 2000) ebenfalls einen aktiven Zustand der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren. In einer kürzlich erschienen Publikation wurde nach Entfernen von bestimmten Bereichen der *Hinge Region* über eine konstitutive Aktivität des TSHR berichtet (Mizutori et al., 2008).



**Abb. 1.7.2. Postulierte Modelle der Rezeptoraktivierung bei Glykoproteinhormon-Rezeptoren.**

A) Das Glykoproteinhormon bindet an die EZD, dadurch können bestimmte Bereiche des Hormons mit der TMD in Wechselwirkung treten und diese aktivieren. B) Die EZD wirkt als inverser Agonist und hält die TMD in einem inaktiven Zustand. Eine Hormonbindung an die EZD unterbindet den hemmenden Effekt der EZD auf die TMD. C) Die Bindung des Hormons an die EZD fördert eine Rezeptorkonformation, in der bestimmte Strukturen der EZD als endogener Agonist die TMD in einen aktiven Zustand überführen.

3. In einer dritten Modellvorstellung ruft die Bindung des Agonisten eine Konformationsänderung des Rezeptors hervor, worauf die EZD über Interaktion mit der TMD eine vermehrte G-Proteinkopplung forciert (Abb. 1.7.2C). Die EZD stellt einen endogenen inversen Agonisten dar. Unterstützt wird dieses Modell u. a. durch die Beobachtung, dass bestimmte Mutationen im C-terminalen Bereich der EZD die agonisteninduzierte Rezeptoraktivierung vermindern, ohne dabei die Rezeptorexpression oder die Hormonbindefähigkeit zu beeinträchtigen (Alvarez et al., 1999). Die Beobachtung, dass aktivierende Mutationen, die in der EZD lokalisiert sind, ihre Wirkung verlieren, wenn Bereiche im N-Terminus der EZD entfernt werden (Sanguhl et al., 2002), ist ebenfalls im Einklang mit diesem Modell.

Neben den drei „klassischen“ Vorstellungen der Rezeptoraktivierung wird ein weiteres Modell diskutiert. Aufgrund von Untersuchungen an mutierten TSHR und FSHR schlagen einige Wissenschaftler eine Kombination des zweiten und dritten Modells vor (Vlaeminck-Guillem et al., 2002; Mizutori et al., 2008; Agrawal & Dighe, 2009). In diesem Modell verhält sich die EZD zunächst als intramolekularer inverser Agonist, verwandelt sich aber durch Hormonbindung oder aktivierende Mutationen in einen angebundenen Agonisten.

## 1.8 Fragestellung

Trotz zahlreicher Studien ist der Wirkmechanismus, nach dem Glykoprotein-hormon-Rezeptoren über Bindung ihrer Liganden von einem inaktiven in einen aktiven Zustand übergehen, nicht ausreichend geklärt. Unterschiedliche Aktivierungsmechanismen werden diskutiert. Insbesondere die Rolle der langen Extrazellulärdomäne in diesem Prozess, die ein wichtiges strukturelles Merkmal der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren darstellt, gibt viele Rätsel auf. Neben der Funktion der Hormonbindung werden für die EZD unterschiedlichste Rollen im hormonabhängigen Aktivierungsprozess diskutiert. Ein hemmender Effekt der EZD auf die Rezeptoraktivität in Abwesenheit des Hormons wird vermutet. Konträr zu dieser Modellvorstellung wird auch eine aktive Rolle der EZD als angebundener Agonist postuliert, der einen aktiven Rezeptorzustand hervorruft. Mit Hilfe von genetisch veränderten Rezeptoren sollte in dieser Arbeit speziell die Rolle der EZD des LH-Rezeptors im ligandenabhängigen Aktivierungsprozess untersucht werden. Hierbei



sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob die LHR-EZD die Transmembrandomäne in Abwesenheit des Hormons in einem inaktiven Zustand hält oder ob sie unter Umständen gar einen positiven Effekt auf eine aktive Rezeptorkonformation ausübt. Darüber hinaus sollten Determinanten in der EZD identifiziert werden, die speziell einen inhibitorischen Effekt hervorrufen bzw. einen positiven Einfluss auf einen aktiven Rezeptorzustand haben. Neben der Untersuchung des Einflusses der EZD auf eine hormoninduzierte Rezeptoraktivierung war auch die Rolle der EZD bei einem durch aktivierende Rezeptormutationen hervorgerufenen, aktiven Rezeptorzustand zu klären. In diesem Zusammenhang sollten etwaige Unterschiede oder Gemeinsamkeiten von ligandenabhängiger und durch Mutationen hervorgerufener Rezeptoraktivierung aufgezeigt werden.

Insgesamt ist das Ziel dieser Arbeit gewesen, einen Beitrag zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Glykoproteinhormon-Rezeptoren – insbesondere des Mechanismus der LHR-Aktivierung – zu leisten.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1 Standardchemikalien und –reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Standardchemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von folgenden Herstellern bezogen:

- J. T. Baker B. V., Deventer, Holland
- Merck, Darmstadt
- Riedel-de Haen AG, Seelze
- Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### 2.1.2 Antibiotika

Substanz	Bezugsquelle
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin G	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich

#### 2.1.3 Antikörper

Substanz	Bezugsquelle
anti-CG $\beta$ -Antiserum, aus Kanninchen	I. Boime, Washington University, St. Louis, MO, USA
anti-HA-IgG (12CA5), monoklonal, aus Maus	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-HA-IgG (3F10), monoklonal, aus Ratte	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-HA-IgG (3F10), monoklonal, aus Ratte, HRP-gekoppelt	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-Kaninchen-IgG (A-6154), monoclonal, aus Ziege, HRP-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
anti-Kaninchen-IgG (F-1763), monoclonal, aus Ziege, FITC-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
anti-Maus-IgG (A-4416), monoklonal, aus Ziege,	Sigma, Deisenhofen

HRP-gekoppelt	
anti-Maus-IgG (F-9006), monoklonal, aus Ziege,	Sigma, Deisenhofen
FITC-gekoppelt	
anti-Ratte-IgG (F-1763), monoklonal, aus	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen, FITC-gekoppelt	

#### 2.1.4 Enzyme, Kits und Größenstandards

Enzyme oder Enzym-System	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt am Main oder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Complete mini <sup>®</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Marker (100 bp und 1 kbp DNA-Ladder)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Probenpuffer („Loading dye“)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Expand <sup>™</sup> High Fidelity System	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleobond PC 100 DNA-Extraktionskit	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>Pfu Turbo</i> -DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TOPO-TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Karlsruhe

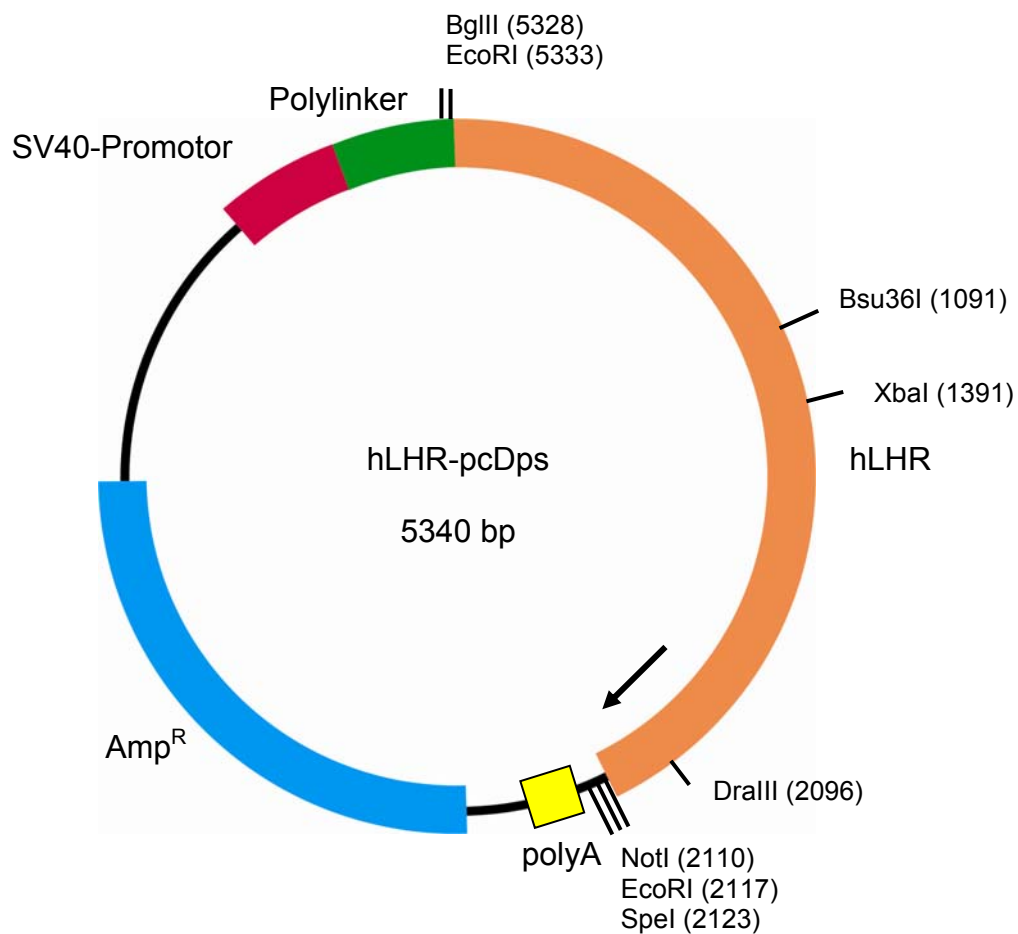
#### 2.1.5 Hormone

Substanz	Bezugsquelle
humanes Choriogonadotropin (hCG), gereinigt, aus humanem Urin, ≥3000 I.E./mg	Calbiochem <sup>®</sup> , Schwalbach/Ts.
humanes Follikel-stimulierendes Hormon (hFSH) (Gonal-F), rekombinant, 600 I.E./ml	Serono Europe Ltd., UK
Thyreoid-stimulierendes Hormon (TSH) (T 8931), aus Rinder-Hypophyse, 2 I.E./mg	Sigma <sup>®</sup> , Deisenhofen

### 2.1.6 Radioaktive Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
[2,8-3H]-Adenin, 31,7 Ci/mmol	PerkinElmer Life Sciences, USA

### 2.1.7 Plasmide



**Abb. 2.1.7. Schematische Darstellung des hLHR im pcDps-Vektor.**

Die Abbildung zeigt den pcDps-Vektor mit der kodierenden Sequenz des hLHR (orange), dem Polyadenylierungssignal (polyA) (gelb), dem Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>) (blau), dem SV40-Promotor (rot) und der Polylinkersequenz (grün). Die in der Arbeit genutzten Restriktionsschnittstellen mit jeweiligem Enzym sind mit schwarzen Strichen dargestellt. Die Position der jeweiligen Restriktionsschnittstelle im Plasmid ist in Klammern angegeben.

Substanz	Bezugsquelle
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
hLHR-pcDps	Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Leipzig
V2LHR-pcDps	Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Leipzig
hFSHR-pcDps	Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Leipzig
hTSHR-pcDps	Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Leipzig
HLGR7-pcDNA3.1 Zeo	Aaron J.W. Hsueh, Division of Reproductive Biology, Department of Obstetrics and Gynecology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

### 2.1.8 Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
FSH 746 rev	GTCGACCTGGCCCTCAGCTTC	Überprüfung der hFSHR-Sequenz
FSH 786 for	CGCCCTCATGGAAGC	Überprüfung der hFSHR-Sequenz
FSH 1426 for	CAGCTGGACTGCAAG	Überprüfung der hFSHR-Sequenz
FSHR-E349K for	CGTGACCTGCTCTCCG <u>AA</u> ACCA GATGCTTTTAA	Austausch von Glutamat zu Lysin an aa 349 des hFSHR mittels in-vitro-PCR- Mutagenese (Sequenz für aa 349 unterstrichen)
FSHR-E349K rev	TTAAAAGCATCTGGT <u>TTT</u> CGGAG AGCAGGTCACG	Austausch von Glutamat zu Lysin an aa 349 des hFSHR mittels in-vitro-PCR- Mutagenese (Sequenz für aa 349 unterstrichen)
FSHR-	TACCCCTACGACGTCCCCGACT	Einfügen eines HA-Epitops in

HAins52neu2f	ACGCCTGTCATCATCGGATCTG TCACTGC	hFSHR nach aa 17 durch in-vitro-PCR-Mutagenese
FSHR- HAins51neu2r	GGCGTAGTCGGGGACGTCGTA GGGGTATCCTGAGCCCAAGCT CAGGAATG	Einfügen eines HA-Epitops in hFSHR nach aa 17 durch in-vitro-PCR-Mutagenese
HA-tag rev	GCGTAGTCGGGGACGTC	Überprüfung der HA-Epitop- Sequenz
hLHR 646 for	GGAGCCTTCCGTGGGGC	Überprüfung der hLHR- Sequenz
hLHR 1436 rev	CGCAGCTTTTGGTCCAGG	Überprüfung der hLHR- Sequenz
hLHR-BspEI1032 f	CCGATGTGCTCC <u>G</u> GAACCAGAT GCT	Einfügen einer BspEI- Schnittstelle in hLHR bei Nukleotid 1032 durch in-vitro- PCR-Mutagenese (ausgetauschte Base unterstrichen)
hLHR-BspEI1032 r	AGCATCTGGTTCC <u>G</u> GAGCACAT CGG	Einfügen einer BspEI- Schnittstelle in hLHR bei Nukleotid 1032 durch in-vitro- PCR-Mutagenese (ausgetauschte Base unterstrichen)
LGR7 243 rev	AGGATATTGGGAAGTCATT	Überprüfung der hLGR7- Sequenz
LGR71985 for	CCTCTTGGGTAGTGATTT	Überprüfung der hLGR7- Sequenz
LH 286 rev	CAGACAAATTGAGGAGGTT	Überprüfung der hLGR7- Sequenz
LH 842 rev	GCACAGCAGTGGCTGGG	Überprüfung der hLHR- Sequenz
LH 1171 for	CTTACAGTGCCTCGTTTTCT	Überprüfung der hLHR- Sequenz/Klonierung
LH 1175 rev	ATGAGAAAACGAGGCACTG	Überprüfung der hLHR- Sequenz/Klonierung

LH 1455 rev	CAGAATGGCATGTCTTAATCGC	Überprüfung der hLHR-Sequenz/Klonierung
LH 1458 for	TATGCTTGGAGG	Überprüfung der hLHR-Sequenz
LH 1562 for	CCACTCTCTCACAAGTC	Überprüfung der hLHR-Sequenz
LH 1742 for	GCATGGCACCTATCTCT	Überprüfung der hLHR-Sequenz/Klonierung
TSH 988 for	CTGGGTGACAGCATTG	Überprüfung der hTSHR-Sequenz/Klonierung
TSH 1704 for	CTGCCTGCCCATGGAC	Überprüfung der hTSHR-Sequenz/Klonierung
pcDps2819rev	CCTCCTCACTACTTCTGG	Sequenzierung des pcDps
pcDps2780f	GCCGCCTCGGCCTCTGAGC	Überprüfung der pcDps-Sequenz/Klonierung
V 106 rev	GCTAGCAGCGGG	Überprüfung der hV2R-Sequenz

## 2.2 Bakterien

Es wurde ausschließlich *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stammes DH5 $\alpha$  für die Vervielfältigung der Plasmide verwendet.

Bakterienstamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-;mr+), <i>phoA</i> , <i>supE44 thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zelllinien

COS-7	Nierenzellen der Grünen Meerkatze	American Type Culture Collection, USA
HEK-293	humane Nierenzellen	American Type Culture Collection, USA

### 2.3.2 Medien für die Zellkultur

Medium	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA, Pasching, Österreich
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich

### 2.4 Geräte

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Analysenwaage Sartorius 2004 MP6	Sartorius AG, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell	Heraeus-Instrument
Dampfsterilisator Varioklav <sup>®</sup>	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Digitalkamera Digital Science DC 120 Zoom	Kodak
Lichtmikroskop Wilovert <sup>®</sup> A	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
LSM 510 META konfokales Laserscanning-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttler Orbital Shaker	Forma Scientific, USA
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pipetten, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl	Gilson, USA
Sterilbank Hera Safe	Heraeus-Instrument
Szintillationszähler Beckman LS 6000IC	Beckman Instruments GmbH, München
Tiefkühlschrank -86C	Forma Scientific, USA
Ultrazentrifuge Beckman L7-55	Beckman Instruments GmbH, München
UV-Bank UV Transilluminator 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge	Heraeus-Instrument



---

Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus-Instrument
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Kendro, Langenselbold

---

## 3 Methoden

### 3.1 Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

#### 3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Es wurden kompetente Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  verwendet (siehe Kapitel 2.2). Die Bakterien wurden kommerziell erworben, anschließend selbst vervielfältigt und durch Behandlung nach dem Protokoll von (Inoue et al., 1990) zur leichteren Aufnahme von Plasmid-DNA befähigt.

##### Lösungen:

1 M MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub>	1 M MgCl <sub>2</sub> und 1 M MgSO <sub>4</sub> in Aqua bidest. lösen und steril filtrieren.
1M MnCl <sub>2</sub>	1 M MnCl <sub>2</sub> in Aqua bidest. lösen und steril filtrieren.
SOB-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl und 2,5 mM KCl in Aqua bidest. lösen, die Lösung autoklavieren und MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> hinzufügen, um eine Endkonzentration von 10 mM zu erreichen.
TB-Puffer	15 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM PIPES und 250 mM KCl in Aqua bidest. lösen, pH 6,7 mit 1 M KOH einstellen, MnCl <sub>2</sub> hinzugeben, bis eine Endkonzentration von 55 mM erreicht ist und anschließend steril filtrieren.

Um *E. coli* zur vermehrten Aufnahme von DNA zu befähigen („kompetente *E. coli*“), wurde ein Glycerolstock mit *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  auf eine keimfreie LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden mehrere Kolonien gepickt und jeweils 250 ml SOB-Medium angeimpft. Die *E. coli* wurden langsam im SOB-Medium bei 18°C und 200 rpm vermehrt, bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 erreichte. Alle folgenden Schritte wurden mit vorgekühlten Lösungen bzw. Gefäßen sowie „auf Eis“ durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min. „auf Eis“ heruntergekühlt, anschließend in Zentrifugengefäße überführt und 10 min. bei 2500 G und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 80 ml TB-Puffer resuspendiert und 10 min. bei 4°C inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die sedimentierten *E. coli* in 20 ml TB-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1,4 ml

DMSO (Endkonzentration: 7%) wurden jeweils 200 µl Aliquots der Bakteriensuspension mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

### 3.1.2 Transformation kompetenter *E. coli* durch Hitzschock

#### Lösungen:

LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, 0,1 g /l Ampicillin in Aqua bidest., pH 7,4
LB-Agar-Platten:	1,5% Agar und 0,1 g/l Ampicillin in LB-Medium, pH 7.4

Um größere Mengen an rekombinanten Plasmiden zu erhalten, wurden Plasmide in kompetente *E. coli* eingeschleust und dort vermehrt. Hierfür wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Durch Erwärmen der Bakterien wird deren Membran durchlässiger, sodass Plasmid-DNA die Bakterienwand leichter durchdringen kann. Die anschließende Selektion der mit dem gewünschten Plasmid transfizierten Bakterien erfolgt mittels eines auf dem Plasmid enthaltenen Antibiotika-Resistenz-Gens.

50 oder 100 µl einer Suspension mit kompetenten DH5α *E. coli* wurden mit 0,3-0,5 µg DNA versetzt und bei 4°C für 30 min inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 sec. Anschließend wurden die Bakterien für 3 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine vorgewärmte LB-Agar-Platte ausplattiert. Nach einer Wachstumsperiode von mindestens 8 h bei 37°C im Brutschrank konnten Bakterienkolonien detektiert werden.

### 3.1.3 Isolierung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-präparation)

#### Lösungen:

S1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0
S2 (Lysispuffer)	0,2 M NaOH; 1% SDS
S3 (Neutralisierungspuffer)	2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde i.d.R. nach Transformation eine Bakterienkolonie einer LB-Agar-Platte in 3 ml LB-Medium für 12 bis 18 Stunden bei

37°C im Schüttelinkubator vermehrt. 2 ml der Bakteriensuspension wurden anschließend bei 5000 G für 5 min. pelletiert und danach in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Lösung mit 200 µl S2-Puffer versetzt und für 5 min. „auf Eis“ inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl S3-Puffer wurden anschließend die Proteine denaturiert, welche nach 5minütiger Inkubation „auf Eis“ bei 15000 G für 10 min. sedimentiert wurden. Der Überstand wurde mit 1 ml 100% Ethanol versetzt und 30 min. bei 15000 G zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und nach vollständigem Trocknen in 30 µl keimfreiem Aqua bidest. aufgenommen.

### 3.1.4 Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midipräparation)

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen wurde der „Nucleobond Plasmid DNA Purification Kit PC 100“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Durch diese Aufreinigungsmethode wird während der DNA-Isolierung im Gegensatz zur Mini-Präparation ein zusätzlicher Reinigungsschritt in Form einer Anionen-Austauscher-Säule durchgeführt.

Lösungen: vgl. Herstellerhandbuch

S1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0
S2 (Lysispuffer)	0,2 M NaOH; 1% SDS
S3 (Neutralisierungspuffer)	2,8 M Kaliumacetat; pH 5,1
N1	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15% Ethanol, 400 mM KCl, pH 6,3
N2	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH 6,3
N3	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15% Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6,3
N4	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8,5

Transformierte Bakterien wurde in 250 ml LB-Medium überführt und 14 bis 18 h bei 37°C und 280 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde bei 5000 G und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden 4 ml S2-Puffer hinzugefügt, und das Gemisch 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation des

Reaktionsgemisches wurden 4 ml des kalten S3-Puffers zugegeben und der Ansatz 5 min. bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde durch einen Faltenfilter gegeben, um die DNA von den denaturierten Proteinen zu trennen. Der klare Durchfluss wurde auf eine zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibrierte Nucleobond-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml N3-Puffer wurde die DNA mit 5 ml N4-Puffer eluiert und mit 3,6 ml 100%igem Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 15000 G und 4°C für 30 min. wurde das DNA-Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 75 bis 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest..

### **3.1.5 DNA-Isolierung durch Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um DNA in Gemischen von eiweißhaltigen Beimengungen und Verunreinigungen zu trennen, erfolgte in einigen Fällen eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierfür wurden DNA-Lösungen mit Wasser auf insgesamt 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Phenol gemischt. Nach gründlichem Mischen von wässriger und organischer Phase wurde die Phasentrennung durch 5minütige Zentrifugation bei 14000 rpm beschleunigt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach Zentrifugation und Überführen der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde eine weitere Extraktion mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation und Überführen der wässrigen Phase wurde die DNA mittels Ethanolfällung von der wässrigen Phase getrennt und nach vollständiger Trocknung in 30 µl Wasser gelöst.

### **3.1.6 DNA-Aufreinigung durch Ethanolfällung**

Mit dieser Methode können alle Nukleinsäuren (sofern sie länger als 50 Nukleotide sind) gefällt werden. Eine Ethanolfällung kann in jedem Größenmaßstab durchgeführt werden, sofern das Volumenverhältnis der Lösungen zueinander eingehalten wird.

#### Lösungen:

Ethanol abs., Ethanol 70%, 3 M Natriumacetat (pH 5,2)

Zu der in wässriger Lösung vorliegenden DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3,2 Volumen Ethanol abs. gegeben. Der Ansatz wurde 20 min. bei 5000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA–Pellet in 70%igem Ethanol resuspendiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 5000 g und 4°C wurde der Überstand entfernt. Die DNA wurde im trockenen Zustand in einer entsprechenden Menge Aqua bidest. gelöst.

### 3.1.7 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit isolierter RNA und DNA kann photometrisch ermittelt werden. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Aminosäuren dagegen bei 280 nm. Aus der Extinktion der zu analysierenden Nukleinsäurenprobe kann die Konzentration anschließend mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt werden:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Lambert-Beersches Gesetz})$$

E = Extrinktion

$\varepsilon$  = Extrinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Bei der photometrischen Messung einer Nukleinsäuren-Lösung in einer Quarzküvette mit einem Durchmesser von 1 cm entspricht eine bei 260 nm gemessene Absorption von 1 einer Konzentration von 50 ng/μl bei doppelsträngiger DNA und von 33 ng/μl bei einzelsträngiger RNA. Die zu messende Lösung wurde mit Aqua bidest. so verdünnt, dass sich die gemessene Absorption im linearen Messbereich zwischen 0,1 und 1,0 befand. Der Quotient aus der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm kann darüber hinaus als Maß für die Reinheit der DNA verwendet werden. Reine DNA weist einen Quotienten von 1,8 auf; bei Vorhandensein von Proteinen verringert sich der Extinktionsquotient entsprechend des Grades der Verunreinigung.

## 3.2 Modifikation von Nukleinsäuren

### 3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (**polymerase chain reaction, PCR**) wird angewendet, um bestimmte Fragmente einer DNA zu vervielfältigen (Mullis & Faloona 1987). Als Matrize für eine PCR wurde Plasmid-DNA oder cDNA genutzt. Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50  $\mu$ l und beinhaltete neben der Matrizen-DNA folgende Komponenten: je 1  $\mu$ l 20  $\mu$ M spezifische Oligonukleotide (Primer), 1  $\mu$ l 20 mM dNTP-Mix, 5  $\mu$ l 10x PCR-Reaktionspuffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1% (v/v) Triton X-100; 15 mM  $MgCl_2$ ) 1-5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Wenn DNA-Fragmente für eine anschließende Klonierung generiert wurden, wurde alternativ zur *Taq*-DNA-Polymerase eine *Pfu*-Polymerase verwendet. Dieses Enzym ist eine hochspezifische 5'→3'-DNA-Polymerase mit einer zusätzlichen 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (proofreading), so dass sie sich durch eine 10-fach niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase auszeichnet. Bei Reaktionen mit einer *Pfu*-DNA-Polymerase wurde ein 10x Reaktionspuffer mit folgender Zusammensetzung benutzt: 200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM Ammoniumsulfat, 20 mM  $MgSO_4$ , 1% (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml nukleasefreies BSA).

Das Einfügen von Mutationen erfolgte über das im Folgenden beschriebene Verfahren.

#### 3.2.1.1 Ortsgerichtete *in vitro*-PCR-Mutagenese mittels QuikChange®-Kit

Mit der *in vitro*-Mutagenese ist es möglich, Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in Plasmid-DNA einzubringen. Dies erfolgt durch eine PCR mit speziell ausgewählten Primern und einem anschließenden Verdau der Matrizen-DNA nach der Anleitung des verwendeten QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kits® (Stratagene).

Es wurden zunächst zwei zueinander komplementäre Primer synthetisiert, die in ihrer Mitte eine Punktmutation, Insertion oder Deletion von Nukleotiden aufwiesen. Anschließend wurde in einem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l 40 ng Plasmid-DNA, 2,5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer, jeweils 125 ng der Primer, 10 nmol dNTP und 1,5  $\mu$ l QuikSolution gemischt. Durch Zugabe von 2,5 U *Pfu Turbo*-Polymerase wurde die Reaktion gestartet, wobei die synthetisierten Amplifikationsprodukte durch den Primereinbau die Mutation aufwiesen.

Um ausschließlich mutierte, neu synthetisierte DNA zu erhalten, musste die ursprüngliche, nicht mutierte DNA abgebaut werden. Diese Matrizen-DNA weist Methylierungen auf, die dem Bakterium normalerweise zur Transkriptionskontrolle dienen. Das Restriktionsenzym *DpnI* erkennt diese methylierten DNA-Sequenzen und baut die Matrizen-DNA ab. Für den enzymatischen Abbau der Matrizen-DNA wurden 25 µl PCR-Produkt mit 5 U *DpnI* versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Ein Abtrennen der DNA vom Reaktionsansatz erfolgte durch eine Ethanol-Fällung (Kapitel 3.1.6). Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz zuerst mit 2 µl 3 M Natriumacetat; pH 5,2 und 65 µl 100% Ethanol für 10 min. bei 4°C gefällt, um ihn anschließend bei 5000 g und 4°C für 20 min. zu zentrifugieren. Das Pellet wurde danach mit 70% Ethanol gewaschen und bei 5000 g und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Nach vollständigem Trocknen des Pellets wurde die DNA in 10 µl Aqua bidest. aufgenommen. Danach erfolgte eine Vervielfältigung der DNA in kompetenten *E. coli*-Bakterien (Kapitel 3.1.2).

**Tab. 3.2.1.1. Temperaturprogramm einer PCR für die Ortsgerichtete *in vitro*-Mutagenese.**

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C	50 sec
		60°C	50 sec
		68°C	2 min/kb Plasmidlänge
3	1	68°C	7 min

### 3.2.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die DNA an spezifischen, palindromischen Sequenzen spalten. Diese gerichtete DNA-Fragmentierung wird u. a. bei dem Herausschneiden eines Fragmentes aus einem Vektor oder zur Analyse von DNA verwendet.

Die Behandlung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben der Hersteller im empfohlenen Reaktionspuffer. Für die Spaltung wurden in der Regel zwischen 0,5 bis 2 µg Plasmid oder PCR-Produkt eingesetzt und mit 1 bis 10 U Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 bis 50 µl für 1 bis 2 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Wurde mit mehreren Enzymen geschnitten, deren Pufferbedingungen für ein ausreichendes Arbeiten nicht



übereinstimmten, wurde erst mit dem Enzym geschnitten, dessen Puffer den niedrigeren Salzgehalt aufwies, anschließend das Enzym bei 65°C denaturiert und danach die Pufferbedingungen für das nächste Enzym angeglichen. Alternativ, konnte die DNA nach der ersten Spaltung durch Ethanol-Zusatz gefällt und dann in den Pufferbedingungen für das zweite Enzym aufgenommen werden. Durch elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel wurde die Spaltung kontrolliert.

### **3.2.3 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden**

Linearisierte Klonierungsvektoren wurden in manchen Fällen vor der Ligation mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) (Fermentas, St. Leon-Roth) behandelt, um mögliche Re-Ligationen des Vektors zu unterbinden. SAP katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphats von DNA und kann im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase aus Kälbern vollständig und irreversibel hitzeinaktiviert werden. Das linearisierte 5'-terminal-phosphorylierte DNA-Fragment wurde mit 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer (Fermentas, St. Leon-Roth) gemischt. Handelte es sich um ein 5'-überhängendes Fragment wurde pro pMol DNA 1 U SAP zugesetzt und 10 min. bei 37°C inkubiert. Bei "blunt"-5'-Enden wurden 5 U SAP verwendet und der Reaktionsansatz 40 min. inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min. bei 65°C inaktiviert.

### **3.2.4 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Um DNA-Fragmente wieder miteinander verknüpfen zu können, wurde das Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet. Dieses Enzym katalysiert den Transfer der endständigen Phosphatgruppe des ATP auf die Hydroxylgruppe der DNA. Hierzu wurden 20 pmol der DNA mit 20 pmol ATP sowie dem entsprechenden Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 50 µl gemischt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 30 min. inkubiert und danach durch rasches Abkühlen „auf Eis“ gestoppt.

### **3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld, das entlang einer Gelmatrix angelegt wird, aufgetrennt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode ist dabei lediglich von der Größe der

Nukleinsäure-Fragmente abhängig. Zur Visualisierung der DNA wird Ethidiumbromid verwendet, das mit der DNA interkaliert und bei Belichtung mit UV-Licht (320 nm) durch orange Fluoreszenz die Lokalisation der DNA anzeigt.

Für die Analyse isolierter DNA wurde in der Regel ein 0,9%iges Agarose-Gel verwendet. Um kleinere DNA-Fragmente ausreichend trennen zu können, wurde in manchen Fällen auch ein 1,2%iges Agarose-Gel genutzt. Für die Herstellung der Gele wurde die erforderliche Agarosemenge mit TAE-Puffer versetzt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst, die klare Lösung auf 50°C abgekühlt, mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen des 6x DNA-Probenpuffer versetzt, in die Taschen des erstarrten Gels gegeben, bei 80 mA aufgetrennt. Zur Auswertung der Agarose-Gele wurde ein UV-Transilluminator herangezogen.

#### Lösungen:

10x TAE-Puffer	10 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (mit konz. Essigsäure eingestellt)
6x DNA-Probenpuffer (6x Loading Dye, Fermentas)	10 mM Tris/HCl, pH 7,6, 60 mM EDTA, 0,03% (m/v) Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol FF, 60% (v/v) Glycerol

### **3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel konnte die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Bestrahlungszeit mit UV-Licht so kurz wie möglich gehalten wurde, um DNA-Schäden zu vermeiden. Das Gelstück wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen. Hierzu wurde das Gelstück gewogen und 300 µl QG-Puffer pro 100 mg Gel hinzu gegeben. Anschließend wurde die Agarose 10 min. bei 50°C geschmolzen. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol wurde der Ansatz in QIAquick-Säulen pipittiert. Die Säule wurde auf ein 2 ml-Sammeltube gesetzt, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde mit QG-Puffer und PE-Puffer mittels Zentrifugation gewaschen. Die Säule wurde durch Zentrifugation getrocknet und auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Die an die Silica-Membran gebundene DNA konnte mit 50 µl Aqua bidest. eluiert werden. Nähere Angaben zu

Pufferlösungen und Durchführungen sind dem Handbuch des "QIAquick Gel Extraction Kit" zu entnehmen.

### 3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Der Vorgang der Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird Ligation genannt. Hierbei werden die DNA-Fragmente mittels des Enzyms T4-Ligase kovalent miteinander verbunden. Je nach Art des Restriktionsenzym bzw. DNA-Polymerase weisen die DNA-Fragmente nach dem Verdau bzw. nach der PCR entweder „blunt ends“ oder „sticky ends“ auf. DNA-Fragmente mit „sticky ends“ haben an ihren Enden Einzelstrangbasenüberhänge, bei DNA-Fragmente mit „blunt ends“ dagegen sind beide Einzelstränge gleich lang. Im Ligationsvorgang lagern sich die komplementären Stränge aneinander, sodass eine Verknüpfung der 3'-OH- mit den 5'-Phosphatgruppen unter ATP-Verbrauch erfolgen kann (Ferretti & Sgaramella 1981). Bei einer „blunt end“-Ligation ist keine Überlagerung von komplementären DNA-Fragmenten möglich, daher ist diese Art der Ligation schwieriger.

Für die Ligation der DNA-Fragmente wurde das kleinere DNA-Fragment („Insert“) je nach Größe im Verhältnis 3:1 bis 5:1 mit dem Vektor plus restlicher cDNA („Vector“) gemischt. 1/10 eines 10-fach konzentrierten T4-Ligase-Puffers, 5 U T4-Ligase sowie zusätzlich 1 µl einer 10 mmolaren ATP-Lösung wurden hinzugegeben und der Reaktionsansatz auf 15 µl aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 2 h oder bei 16°C über Nacht. Nach beendeter Reaktion wurden die ligierten Plasmide zur Vervielfältigung in kompetente *DH5α*-Bakterien eingeschleust (Kapitel 3.1.2).

Bei einer DNA-Fragment-Amplifikation mittels PCR wurde die Ligation nach der Vorschrift des „TOPO TA Cloning Kits“ der Firma Invitrogen durchgeführt. Während der Amplifikation synthetisiert die verwendete *Taq*-Polymerase am 3'-Ende des Amplifikationsproduktes PolyA-Überhänge. Der linearisierte TA-Vektor weist an seinem 3'-Enden komplementäre T-Überhänge auf. Eine Ligase, die direkt an den Vektor gekoppelt ist, kann das im Reaktionsgemisch vorhandene DNA-Fragment somit direkt in den Vektor einfügen. 2 µl DNA-Fragment wurden mit 0,5 µl 1,2 M NaCl 0,06 M MgCl<sub>2</sub> und 1 µl Topo-Cloning-Vector versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.3 Methoden der eukaryontischen Zellkultur**

#### **3.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Die in Kapitel 2.3.1 aufgelisteten Zelllinien wurden als adhärente Zellen in sterilen Plastik-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% FKS sowie einem Zusatz von 100 I.U./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Alle Zellen wurden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Heraeus) mit einem Luftanteil von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Wurde ein dichter Zellrasen erreicht, mussten die Zellen ausgedünnt werden. Das Ausdünnen der Zellen variierte je nach Zelltyp und benötigter Zellmenge, indem die Hälfte bis ein Zwanzigstel der Zellen wieder ausgesät wurde. Zum Ausdünnen einer Zellpopulation, die den Boden einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche bedeckten, wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS ohne Zusatz von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und mit 2 ml Trypsin für ca. 1 min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 6 ml Nährmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein steriles 15 ml-Falcontube überführt. Um die Zellen vom trypsinhaltigen Nährmedium zu trennen, wurde die Zellsuspension 4 min. bei 1000 rpm zentrifugiert (Heraeus, Megafuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Verdünnungsfaktor in frischem Medium suspendiert und in neue Flaschen mit vorgelegtem Medium verteilt.

#### **3.3.2 Kryokonservierung kultivierter Zellen**

Zellen können durch ein bestimmtes Einfrierverfahren, das sich Kryokonservierung nennt, für mehrere Jahre unbeschadet gelagert werden. Um bei dem Prozess des Einfrierens die Bildung von Wasserkristallen und damit eine Zerstörung der Zellen zu verhindern, werden die Zellen bei diesem Verfahren in einem DMSO-haltigen Nährmedium mit einer Temperaturerniedrigung von 1°C/min. eingefroren.

Die unter 2.3.1 aufgelisteten Zellen wurden, wenn sie den Boden einer 75cm<sup>2</sup>-Flasche komplett bedeckten, zunächst wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit Trypsin vom Boden abgelöst und anschließend durch Zentrifugation vom trypsinhaltigen Nährmedium getrennt. Das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem Nährmedium, dem 10% DMSO zugesetzt war, resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen abgefüllt. Die Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß

auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gelagert wurden.

### 3.3.3 Transiente Transfektion

Bei der „transienten Transfektion“ wird Fremd-DNA zur Expression der gewünschten Proteine in eukaryontische Zellen vorübergehend eingeschleust, d. h. die Fremd-DNA wird mittels eines Transfektionsreagenzes in die Zellen gebracht, wobei sie i.d.R. nach einer gewissen Zeit in den Zellen abgebaut wird. Die Einschleusung von Plasmid-DNA mit einem SV40-Promotor in die in Kapitel 2.3.1 aufgelisteten Zelllinien führt zur Transkription der eingeschleusten DNA und zur Expression der gewünschten Proteine in diesen Zellen. Als Transfektionsreagenz wurden polykationische Lipide (Metafectene<sup>®</sup>, Biontex Laboratories GmbH) verwendet. Diese bilden mit der negativ geladenen DNA Liposomen-Nukleinsäure-Komplexe, die sich an der Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Je nach Zellzahl wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz verwendet.

## 3.4 Proteinbiochemische Methoden

### 3.4.1 Lyse kultivierter COS7-Zellen zur Untersuchung in Western-Blot-Analysen

Neben Membranpräparationen wurde gewöhnliche Zell-Lysate für Western-Blot-Analysen verwendet. Um ein Lysat der in Kultur vermehrten Zellen für eine Western-Blot-Analyse zu erhalten, wurden transfizierte Zellen einer 6-Loch-Platte zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und schließlich durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  2x Laemmli-puffer (125 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerol, 4% (m/v) SDS, 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,01% (m/v) Bromphenolblau, pH 6,8) lysiert. Mittels eines Zellschabers wurden die lysierten Zelltrümmer anschließend vom Boden abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in einer Spritze mit einer 0,5 x 25 mm-Nadel wurden die Proben unverzüglich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 3.4.3) wurden die kultivierten Zellen in manchen Fällen nach Waschen mit eiskaltem PBS mit einem weiteren Volumen eiskaltem PBS versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers zerkleinert. Die Zellsuspension wurden auf 2 Eppendorfcups verteilt, wobei 1/5 zur

Proteinbestimmung und 4/5 zur Western-Blot-Analyse herangezogen wurden. Alle Proben wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets je nach Art der Untersuchung in entsprechende Puffer aufgenommen.

### 3.4.2 Gesamtmembranpräparation von transfizierten COS7-Zellen

Zur Isolation der heterolog exprimierten LHR-Varianten wurden Gesamtmembran-Präparationen der transfizierten COS7-Zellen erstellt. Hierfür wurden pro Rezeptorsvariante  $3,6 \times 10^6$  COS7-Zellen in zwei sterile 10 cm-Petrischalen ausgesät (10 ml einer Zellsuspension mit  $1,8 \times 10^5$  Zellen/ml pro Petrischale). 18 bis 20 h nach Aussaat erfolgte die Transfektion. Folgende Transfektionsansätze wurden hierzu zusammenpipettiert:

#### Ansatz 1:

Anzahl 10cm-Petrischalen	Menge Rezeptor-DNA	Nährmedium
1	8,5 µg	ad 1260 µl
2	17 µg	ad 2520 µl

#### Ansatz 2:

Anzahl 10cm-Petrischalen	Volumen Metafectene®	Nährmedium
1	25,5 µl	ad 1260 µl
2	51,0 µl	ad 2520 µl

Die Ansätze wurden gemischt und 30 bis 40 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie zum Nährmedium in den Petrischalen hinzugefügt und die Zellen für 6 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte ein Austausch des Nährmediums. Zur Unterbindung der N-Glykosylierungsreaktion bei der Reifung der LHR-Proteine in COS7-Zellen wurden einigen Petrischalen nach Transfektion 2 µM Tunicamycin zugesetzt und die Zellen für 14 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Nach Austausch des Tunicamycin-haltigen Mediums durch frisches Nährmedium erfolgte eine Inkubation der Zellen für weitere 16 bis 28 h bei gleichen Bedingungen. 36 bis 48 h nach Transfektion erfolgte die Aufarbeitung aller Zellen. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml eiskaltem PBS je Petrischale wurden die Zellen für 5 min. mit 5 ml Lysepuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 Tablette COMPLETE MINI® in 7 ml Puffer) „auf Eis“ inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Schalenboden abgelöst und in ein 15 ml-Zellkulturröhrchen überführt. Danach erfolgte

eine Homogenisation der Zellsuspension mittels einer Spritze mit 0,5 x 25 mm-Nadel, wobei die Zellsuspension sechsmal in die Spritze aufgezogen und hinausgepresst wurde. Durch 10minütige Zentrifugation bei 600 G und 4°C konnten die Zellkerne gefällt werden. Die anschließende Sedimentation der Membranen erfolgte durch Zentrifugation des Überstandes bei 100000 G und 4°C für eine Stunde, wobei sich ein klares bis gelbliches, geleeartiges Pellet abzeichnete. Dieses Pellet wurde in 100 oder 200 µl des Lysepuffers aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Analyse von Proteingemischen wurde der DC Protein Assay<sup>®</sup> von Pierce verwendet. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Proteinbestimmung, die nach dem gleichen Prinzip wie die quantitative Analyse nach Lowry funktioniert. In alkalischer Lösung werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Anwesenheit von Proteinen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, wobei diese mit Bicinchoninsäure, ein wasserlösliches, violettees Reaktionsprodukt im Verhältnis 1:2 bilden. Bei 562 nm kann eine photometrische Quantifizierung des Komplexes und somit der Proteine erfolgen. Die Messung wurde in einer Mikrotiterplatte an einem Photometer (Dynatech MR4000) durchgeführt. Vor jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderserum-Albumin (Stammlösung 1 g/ml) erstellt, anhand derer der Proteingehalt der eingesetzten Proben bestimmt wurde. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Die Polyacrylamid-Gele unterteilen sich in ein Sammelgel, das etwa 2–3 cm einnimmt, und ein darunter liegendes Trenngel. Die Ionenverhältnisse der beiden Gele unterscheiden sich, sodass die zu trennenden Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Lauffront konzentriert werden, um anschließend gemeinsam in das höher vernetzte Trenngel eintreten zu können, wo sie nach ihrer Größe getrennt werden. In einen Polymerisationsprozess erfolgte die Herstellung der Gele aus Flüssigkeitsgemischen. Hierbei wurde zunächst das Flüssigkeitsgemisch für das Trenngel (Tab. 3.4.4) zwischen zwei abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten

gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Verfestigung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, mit Wasser gespült und das überschüssige Wasser entfernt. Der Reaktionsansatz für das Sammelgel (Tab. 3.4.4) wurde auf das Trenngel gegossen, wobei zur Bildung von Probestaschen sofort ein Kamm eingeführt wurde. Nach vollständiger Polymerisation konnten die Gele in die vorgesehene Apparatur mit dazugehöriger Gelkammer eingesetzt werden. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt, wobei ein Erhitzen der Proben vermieden wurde. 75 oder 100 µg Gesamtprotein einer Probe wurde jeweils in eine Tasche gefüllt. Ungenutzte Taschen wurden mit Laemmli-Laufpuffer aufgefüllt, um eine gerade Lauffront zu gewährleisten. In eine Tasche des Gels wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 20 mA für ca. 1,5 bis 2 h. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Kapitel 3.4.5).

#### Lösungen:

2x Laemmli-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20% (v/v) Glycerol, 4% (m/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,01% (m/v) Bromphenolblau
1x Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (m/v) SDS
4x Tris/HCl/SDS, pH 8,8	0,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS
4x Tris/HCl/SDS, pH 6,8	1,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% SDS

**Tab. 3.4.4. Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.**

#### Trenngel:

Acrylamid-Konzentration des Trenngels	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %	12 %
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid [ml]	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0
4x Tris/HCl/SDS, pH 8,8 [ml]	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Aqua bidest. [ml]	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25	5,25
10% (m/v) Ammoniumpersulfat [ml]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED [ml]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01



Tab. 3.4.4. Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen (Fortsetzung).

Sammelgel:

Acrylamid-Konzentration des Sammelgels	3,9 %
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid [ml]	0,65
4 x Tris/HCl/SDS, pH 6,8 [ml]	1,25
Aqua bidest. [ml]	3,05
10% (m/v) Ammoniumpersulfat [ml]	0,05
TEMED [ml]	0,01

**3.4.5 Western-Blot-Analyse und Immundetektion**Lösungen:

Transferpuffer	25 mM Tris/HCl; 1,9 mM Glycin; 0,2% (v/v) SDS; 20% Methanol
PBS	1,37 M NaCl; 81 mM Natriumhydrogenphosphat; 27 mM KCl; 14,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
PBS-T	PBS; 0.1% (v/v) Tween, pH 7,4

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens wurden in dieser Arbeit Proteine nach Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um sie mittels Antikörpern einfacher detektieren zu können. Der Transfer der Proteine erfolgte nach der Wet-Methode. Hierfür nutzte man zum Transfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran einen wässrigen Puffer. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine zunächst vorsichtig von den Glasplatten gelöst und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden zwei Lagen mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf die Transferapparatur gelegt. Darauf wurden zuerst das Gel, dann die in Transferpuffer eingelegte Nitrocellulose-Membran (Hybond C extra, Amersham Biosciences) und zuletzt wieder eine Lage Transferpuffer-getränktes Filterpapier gelegt, sodass ein „Sandwich“ entstand. Die Transferapparatur wurde mit Transferpuffer befüllt. Der Transfer erfolgte bei 280 mA für eine Stunde oder bei 90-100 mA über Nacht.

Zur Immundetektion der LHR-Varianten wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran mit Roti-Block® (Roth) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Nach kurzem Waschen mit PBS erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit 50 mU/ml eines HRP-gekoppelten anti-HA-Antikörpers (3F10, Roche Diagnostics) in einer 5% Magermilchpulver-haltigen PBS-Lösung. Bei der Analyse von LHR-Varianten, die kovalent an hCG gebunden waren, erfolgte die Detektion hingegen mittels eines Zwei-Antikörper-Systems. In diesem Fall wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst mit PBS-Lösung versetzt, die neben 5% Magermilchpulver ein gegen die  $\beta$ -Untereinheit des hCG gerichtetes Kaninchen-Antiserum in der Verdünnung 1:4000 oder 1:6000 enthielt. Nach 1- bis 2stündiger Inkubation bei Raumtemperatur bzw. einer Inkubation bei 4°C h über Nacht wurde die Membran dreimal für 10 min. mit PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde der HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper (A-6154, Sigma) 1:1000 mit einer 5%igen Magermilchpulver-PBS-Lösung verdünnt. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit dieser Antikörperlösung inkubiert. Nach zweimaligem 10minütigem Waschen mit PBS-T und anschließendem Waschen mit PBS konnten reaktive Banden mit Hilfe des ECL-Detektionssystems (Amersham Biosciences) nachgewiesen werden. Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um ein hochempfindliches nicht-radioaktives Verfahren. Das an die Antikörper gebundene Enzym HRP katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid). Die Lichtemission, die bei dieser Reaktion freigesetzt wird, dient zur Belichtung des auf der Nitrocellulose-Membran liegenden Röntgenfilms. Nach Entwicklung des Röntgenfilms (Biomax, Kodak) mit Dokumol (TETENAL AG & CO. KG) und anschließender Behandlung mit Fixierlösung ist eine Schwärzung des Röntgenfilms an entsprechenden Stellen zu verzeichnen.

#### **3.4.6 Zelloberflächenexpressions-ELISA**

Die ELISA-Methode (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurde zum ersten Mal 1971 von Engvall et al. zur quantitativen Bestimmung von Antigenen eingesetzt (Engvall et al., 1971). In dieser Arbeit wurde zur quantitativen Bestimmung der Zelloberflächenexpression von LHR-Varianten eine modifizierte ELISA-Methode genutzt. Hierbei wurden Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte Epitope der Rezeptorproteine gerichtet waren.

Zur Untersuchung der Zelloberflächenexpression von heterolog in COS7-Zellen exprimierten LH-Rezeptorvarianten wurden 3 bis  $3,5 \times 10^4$  COS7-Zellen in jedes Loch einer sterilen 24-Loch-Platte ausgesät (0,5 ml einer Zellsuspension mit 6 bis  $7 \times 10^4$  Zellen/ml pro Loch). 18 bis 20 h nach Aussaat erfolgte die Transfektion der Rezeptorvarianten. Hierfür wurden Zellen in drei Löchern einer 24-Loch-Platte jeweils mit einer Rezeptorvariante transfiziert, sodass Dreifachbestimmungen durchgeführt werden konnten. In der Regel wurden 0,6 µg DNA und 1,8 µl Metafectene® (Verhältnis 1:3) in jedes Loch pipettiert. Folgende Transfektionsansätze wurden hergestellt:

**Tab. 3.4.6: Transfektionsansätze je Rezeptorvariante zur Durchführung eines Zelloberflächen-expressions-ELISA (Berechnung für 3,5 Löcher einer 24-Loch-Platte).**

Ansatz A:

DNA-Menge [µg]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
2,1	ad 70

Ansatz B:

Menge Metafectene® [µl]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
6,3	ad 35

Wie in Tab. 3.4.6 angegeben wurde die DNA und das Transfektionsreagenz Metafectene® (Biontex Laboratories GmbH) zunächst in getrennten Ansätzen in serumfreiem Nährmedium gelöst und anschließend die Ansätze vereinigt. Nach 30- bis 40minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 30 µl dieser Lösung in jedes Loch gegeben. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 6 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach einem Austausch des Nährmediums durch frisches Nährmedium wurden die Zellen für weitere 24 bis 48 h im Brutschrank gehalten. Die Zellen jeden Loches wurden zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur für 10 bis 15 min. mit 250 µl 10%iger Formalin-Lösung behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl einer PBS-Lösung wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 1 Stunde bei 37°C mit einer 10%igen FBS-DMEM-Lösung versetzt. 200 µl einer DMEM-Lösung, die neben 10% FBS 2 µg/ml eines Maus-anti-HA-Antikörpers (12CA5, Roche Diagnostics) enthielt, wurde in jedes Loch gegeben. Nach 1stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen jedes Loches dreimal für 3 min. mit 500 µl PBS gewaschen. 200 µl eines HRP-gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers (A-4416, Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:2500 in 10% FBS-haltigem DMEM jedem Loch zugesetzt und die Zellen für 1 h bei 37°C gehalten.

Zellen, die LHR-Varianten exprimierten, an die kovalent hCG gebunden war, wurden im Gegensatz dazu zunächst für 1 h bei 37°C mit einer DMEM-Lösung behandelt, die neben 10% FBS ein gegen die hCG $\beta$ -Untereinheit gerichtetes Kaninchen-Antiserum in einer Verdünnung von 1:4000 oder 1:6000 enthielt. Nach dreimaligem 3minütigem Waschen mit einer PBS-Lösung wurden die Zellen bei 37°C mit einer DMEM-Lösung behandelt, die neben 10% FBS einen HRP-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (A-6154, Sigma) in einer Verdünnung von 1:1000 enthielt. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit 500  $\mu$ l PBS pro Loch für jeweils 3 min. und anschließend die Zugabe von 300  $\mu$ l/Loch „1-Step Turbo TMB-ELISA“-Lösung (Pierce). „1-Step Turbo TMB-ELISA“-Lösung enthält 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin, welches unter Oxidation durch Wasserstoffperoxid eine intensive blaue Färbung hervorruft. Je mehr Wasserstoffperoxid-Moleküle durch die an die Antikörper gebundene HRP gebildet wird, desto intensiver ist die Blaufärbung. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l/Loch 1molarer Schwefelsäure nach 30minütiger Reaktion wechselt die blaue Farbe in eine gelbe mit einem Absorptionmaximum bei 450 nm. Die Extinktionsmessung erfolgte daher bei 450 nm an einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELX800G, MWG Biotech), wobei 300  $\mu$ l jedes Loches der 24-Loch-Platte jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt wurde und die Messung anschließend in der 96-Loch-Platte erfolgte. In jedem Versuch wurde für jede Variante bzw. für Zellen, welche die jeweilige Variante exprimierten, eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt.

### 3.4.7 Immunfluoreszenz-Studien

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Studien konnten in dieser Arbeit einzelne Zellen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von LH-Rezeptorproteinen analysiert werden. Hierbei nutzte man mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper, die gegen Strukturen der Rezeptorvarianten gerichtet waren. Als Resultat einer solchen Markierung mit Antikörpern war eine Fluoreszenz nachweisbar gewesen, die mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops erfasst werden konnten.

Für ein Immunfluoreszenz-Experiment wurden 1,5 bis 1,6  $\times 10^5$  COS7-Zellen in Löcher einer 6-Loch-Platte gesät (2 ml einer Zellsuspension mit 7,5 bis 8  $\times 10^4$  Zellen/ml pro Loch), wobei jedes Loch ein sterilisiertes Glasplättchen enthielt. 18 bis 20 h nach Aussaat erfolgte die Transfektion der Rezeptorvarianten. Für jede Rezeptorvariante wurden folgende Transfektionsansätze, berechnet für zwei Löcher, angesetzt:

**Tab. 3.4.7: Transfektionsansätze je Rezeptorvariante zur Durchführung eines Immunfluoreszenz-Experimentes (Berechnung für zwei Löcher einer 6-Loch-Platte).**

Ansatz A:

DNA-Menge [µg]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
4,0 bis 5,0	ad 200

Ansatz B:

Menge Metafectene® [µl]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
12 bis 15	ad 200

Wie in Tab. 3.4.7 angegeben, wurde die DNA und das Transfektionsreagenz Metafectene® zunächst in getrennten Ansätzen in serumfreiem DMEM-Nährmedium gelöst und dann die Ansätze vereinigt. Nach 30 bis 40minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 200 µl der vereinigten Ansätze in ein Loch gegeben. Nach 6stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Nährmedium durch frisches ersetzt und die Zellen für weitere 36 Stunden bei gleichen Bedingungen bebrütet. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS pro Loch wurden die Zellen eines Loches für 10 min. mit 1 ml einer 10%iger Formalin-Lösung auf den Glasplättchen fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS pro Loch erfolgte für 1 bis 1,5 h die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit einer 10%igen FBS-DMEM-Lösung (2 ml/Loch) bei 37°C im Brutschrank. Die Zellen wurden danach bei gleichen Bedingungen für 1 h mit einer FBS-haltigen DMEM-Lösung, die einen Ratten-Anti-HA-Antikörper (3F10, Roche Diagnostics) in der Konzentration von 0,5 bis 1 µg/ml enthielt, behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit 2 ml PBS pro Loch für 3 min. wurde der Zweitantikörper, ein FITC-markierter Anti-Ratten-Antikörper (F-1763, Sigma), in einer Verdünnung von 1:640 in 10%iger FBS-DMEM-Lösung bei 37°C für 30 min. auf die Zellen gegeben. Im Gegensatz dazu, wurden COS7-Zellen, die LHR-Varianten mit kovalent gebundenem CGβα exprimierten, zunächst mit einer Nährlösung behandelt, die neben 10% FBS ein gegen die hCGβ-Untereinheit gerichtetes Kaninchen-Antiserum in einer Verdünnung von 1:4000 oder 1:6000 enthielt, wobei die Zellen 1 bis 2 h bei 37°C gelagert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 3 min. erfolgte die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper (F-1763, Sigma), der in 10% FBS enthaltendes DMEM aufgelöst war. Danach wurden die Zellen dreimal für 3 min. mit PBS gewaschen. Nach einmaligem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Glasplättchen mit Fluoromount-Eindeckmedium (Dako) auf einem

Objektträger fixiert und unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) bei einer Wellenlänge von 530 nm ausgewertet.

### 3.4.8 cAMP-Akkumulationsassay

Mit Hilfe eines cAMP-Akkumulationsassays können relative Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration, die z. B. durch die Aktivität  $G_s$ -koppelnder Rezeptoren beeinflusst wird, gemessen werden. Über eine quantitative Erfassung des Second Messengers cAMP lassen sich Rückschlüsse hinsichtlich der Aktivität des jeweils heterolog exprimierten  $G_s$ -koppelnden Rezeptors ziehen.

Bei einem cAMP-Akkumulationsassay wurden für diese Arbeit Zellen, die LHR-Varianten exprimierten, mit tritiiertem Adenin inkubiert. Dieses radioaktiv markierte Adenin wurde in die Zellen aufgenommen und dort zu ATP umgesetzt. Nach Stimulation der jeweiligen LHR-Variante wurde über  $G_s$  die Adenylatzyklase der Zellen vermehrt aktiviert und cAMP aus ATP gebildet, wobei auch radioaktiv markiertes ATP zu cAMP umgesetzt wurde. Durch Blockade des cAMP-Abbaus mittels Methylxanthinderivaten reicherte sich das gebildete cAMP in den Zellen an. Nach Zellaufschluss konnte das cAMP säulenchromatographisch von Adenin, AMP, ADP und ATP getrennt werden (Salomon et al., 1974). Der Anteil des radioaktiv markiertem cAMP wurde mittels eines Szintillationszählers erfasst.

In der Praxis wurden 1 ml einer Zellsuspension mit 7 bis  $8 \times 10^4$  COS7-Zellen in jedes Loch einer 12-Loch-Platte ausgesät. 18 bis 20 h nach Aussaat wurden für jede Rezeptorvariante Transfektionsansätze (Tab. 3.4.8) angesetzt, wobei den Zellen eines Loches für den Transfektionsprozess 0,5 µg DNA und 1,5 µl Metafectene<sup>®</sup> zugesetzt wurde.

**Tab. 3.4.8: Pipettierschema eines Transfektionsansatzes je Rezeptorvariante zur Durchführung eines cAMP-Akkumulationsassays (Berechnung für fünf Löcher).**

#### Ansatz A:

DNA-Menge [µg]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
2,5	ad 175

#### Ansatz B:

Menge Metafectene <sup>®</sup> [µl]	Volumen serumfreies DMEM [µl]
7,5	ad 175

Lösungen:

Lyselösung	5% Trichloressigsäure, 1 mM ATP, 1 mM cAMP
Regenerationslösung 1 für Aluminiumoxid-Säulen	0,5 M Tris/HCl, pH 7,4
Regenerationslösung 2 für Aluminiumoxid-Säulen	0,1 M Imidazol/HCl, pH 7,4
Regenerationslösung für Dowex-Säulen	1 M HCl

Wie in Tab. 3.4.8 angegeben wurde die DNA und das Transfektionsreagenz Metafectene<sup>®</sup> zunächst in getrennten Ansätzen in serumfreiem Nährmedium gelöst und anschließend die Ansätze vereinigt. Nach 30- bis 40minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 70 µl eines Transfektionsansatzes in jedes der vier vorgesehenen Löcher pipettiert. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Nährmedium durch frisches ersetzt. 18 bis 22 h nach Transfektion erfolgte die Inkubation mit 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-Adenin für 18 bis 20 h im Brutschrank. Am Tag der Aufarbeitung wurden die Zellen eines Loches zunächst mit 1 ml serumfreiem DMEM gewaschen und danach mit 1 ml/Loch einer 1 mmolaren IBMX-DMEM-Lösung für 20 min. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zwei der vier Löcher wurde zur Maximalstimulation der exprimierten Rezeptorvarianten der jeweilige Agonist (1 µM hCG, 100 mU/ml hFSH oder 100 mU/ml bTSH in serumfreiem DMEM) zugesetzt. Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven von bestimmten LH-Rezeptorvarianten wurden jeweils die Zellen zweier Löcher mit derselben hCG-Konzentration versetzt (Doppelbestimmung), wobei hCG in der Konzentration von 1 µM bis 1 pM verwendet wurde. Mit Hilfe einer Lyselösung aus 5% Trichloressigsäure, 1 mM ATP und 1 mM cAMP (1 ml/Loch) wurden alle Zellen aufgeschlossen. Die säulenchromatographische Auftrennung erfolgte über ein Zwei-Säulen-System, einer Dowex-Säule (AG 50W-X8, Bio-Rad Laboratories GmbH) und einer Aluminiumoxid-Säule, die zuvor regeneriert werden mussten. Zur Regeneration der Dowex-Säulen wurden diese jeweils mit 5 ml einer 1molaren Salzsäure versetzt und danach mit 10 ml Aqua bidest. gewaschen. Die Aluminiumoxid-Säulen wurden mit 10 ml Regenerationslösung 1, 10 ml Aqua bidest. und abschließend mit 10 ml Regenerationslösung 2 behandelt. Der Inhalt der aufgeschlossenen Zellen jeder Probe wurde zunächst jeweils auf eine Dowex-Säule gegeben und die Säulen je mit 2 ml Aqua bidest. gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen, die Dowex-Säulen auf die

---

Aluminium-Säulen so platziert, dass nach Spülen der Dowex-Säulen mit je 10 ml Aqua bidest. der Durchfluss auf die Aluminiumoxid-Säule tropfte. Nach einem Waschschrift mit 5 ml Aqua bidest. pro Säule wurde das cAMP von der Aluminiumsäule mit 5 ml je Säule Regenerationslösung 2 abgewaschen. Die Messung der Proben in einem Szintillationszähler (LS 6000IC, Beckman) erfolgte nach Zusatz von 15 ml Szintillationscocktail (Rotiszint® eco plus, Roth).



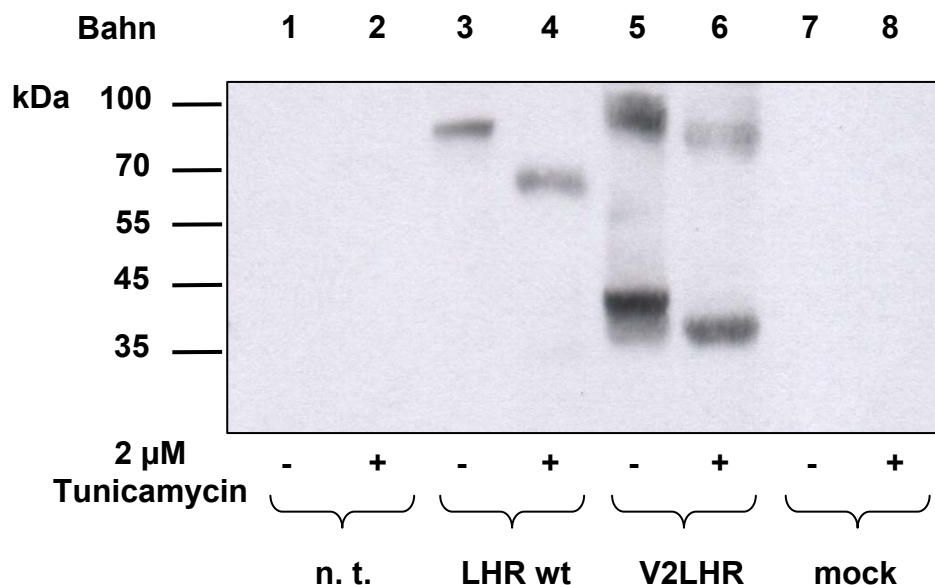
## 4 Versuchsergebnisse

### 4.1 Erniedrigung der Rezeptoraktivität des LHR durch Entfernen oder Verkürzung der Extrazellulärdomäne

Ein herausragendes strukturelles Merkmal der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren ist ihre lange Extrazellulärdomäne, die das N-terminale Ende der Rezeptoren darstellt. Aufgrund von Untersuchungen am TSHR postulieren einige Wissenschaftler ein Modell der Rezeptoraktivierung, bei dem die EZD der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren über Wechselwirkung mit der TMD den Rezeptor in einem inaktiven Zustand hält. In diesem Modell fungiert die EZD als intramolekularer inverser Agonist. Aktivierende Rezeptormutationen sowie die Bindung des Hormons an die EZD unterbinden diesen Effekt und rufen eine erhöhte Rezeptoraktivität hervor. Um zu überprüfen, ob diese Modellvorstellung auch auf andere Glykoprotein-hormon-Rezeptoren, in diesem Fall auf den LHR, zuträfe, wurden zwei LHR-Varianten mit verkürzter oder fehlender EZD hergestellt und hinsichtlich ihrer Signaltransduktionseigenschaften untersucht. Der ersten Variante fehlte die gesamte EZD (V2LHR), wohingegen die zweite Mutante N-terminal verkürzt wurde, allerdings noch die *Hinge Region* enthielt (V2hingeLHR). Sangkuhl et al. berichteten, dass LHR, denen die komplette EZD fehlt, nur unzureichend an der Zelloberfläche exprimiert werden (Sangkuhl et al., 2002). Um nach Entfernen der EZD dennoch einen LHR mit ausreichenden Oberflächenexpressionseigenschaften zur Verfügung zu haben, fügten sie den N-Terminus des humanen V2-Vasopressin-Rezeptors (hV<sub>2</sub>R) in den aminoterminal verkürzten LHR ein und erhielten die Mutante V2LHR. In gleicher Weise verfahren wir mit der Variante V2hingeLHR. Alle Rezeptoren wurden mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) versehen, um deren Lokalisation in der Zelle mittels Antikörpern nachweisen zu können. Weitere Informationen bezüglich der verkürzten LHR-Varianten ist Abb. 4.1.3A und Tab. 8.1 zu entnehmen.

Zunächst überprüften wir, ob die N-terminal verkürzten LHR-Varianten in einem ausreichenden Maß in einem heterologen Expressionssystem gebildet werden. Hierzu wurden für eine Western-Blot-Analyse die cDNA des Wildtyp-Rezeptors (LHR wt) sowie der Variante ohne native EZD (V2LHR) in COS7-Zellen eingeschleust und nach Expression der Rezeptoren die Zellmembranen in einer Membranpräparation (Kapitel 3.4.2) isoliert. Eine Analyse der Zellmembranen ergab, dass für den Wildtyp-LHR sowie V2LHR spezifische Proteine nachgewiesen werden konnten, die

nicht in Membranen von nicht-transfizierten („n.t.“) oder mit dem Leervektor transfizierten („mock“) COS7-Zellen zu identifizieren waren (Abb. 4.1.1). In Zellmembranen von COS7-Zellen, die den Wildtyp-LHR bildeten, ließ sich eine spezifische Bande mit einem ungefähren Molekulargewicht von 85 kDa nachweisen, bei der es sich um die reife, glykosylierte Form des Rezeptors gehandelt haben dürfte (Abb. 4.1.1, Bahn 3). Die Hemmung der N-Glykosylierung des Rezeptors durch Tunicamycin-Behandlung verringerte das Molekulargewicht des Proteins auf 68 kDa (Abb. 4.1.1, Bahn 4). Die Variante V2LHR konnte in COS7-Zellen als ein 40-kDa-Protein identifiziert werden, dessen Molekulargewicht sich durch Tunicamycin-Behandlung auf 38 kDa reduzierte (Abb. 4.1.1, Bahn 5 und 6). Zusätzlich wurde in der Zellmembran von V2LHR-exprimierenden Zellen eine weitere Bande mit einem höheren Molekulargewicht (>90 kDa) nachgewiesen, deren Molekulargewicht sich durch Tunicamycin-Behandlung ebenfalls verringerte. Bei dieser Bande könnte es sich um eine Oligomer-Ansammlung des V2LHR gehandelt haben.

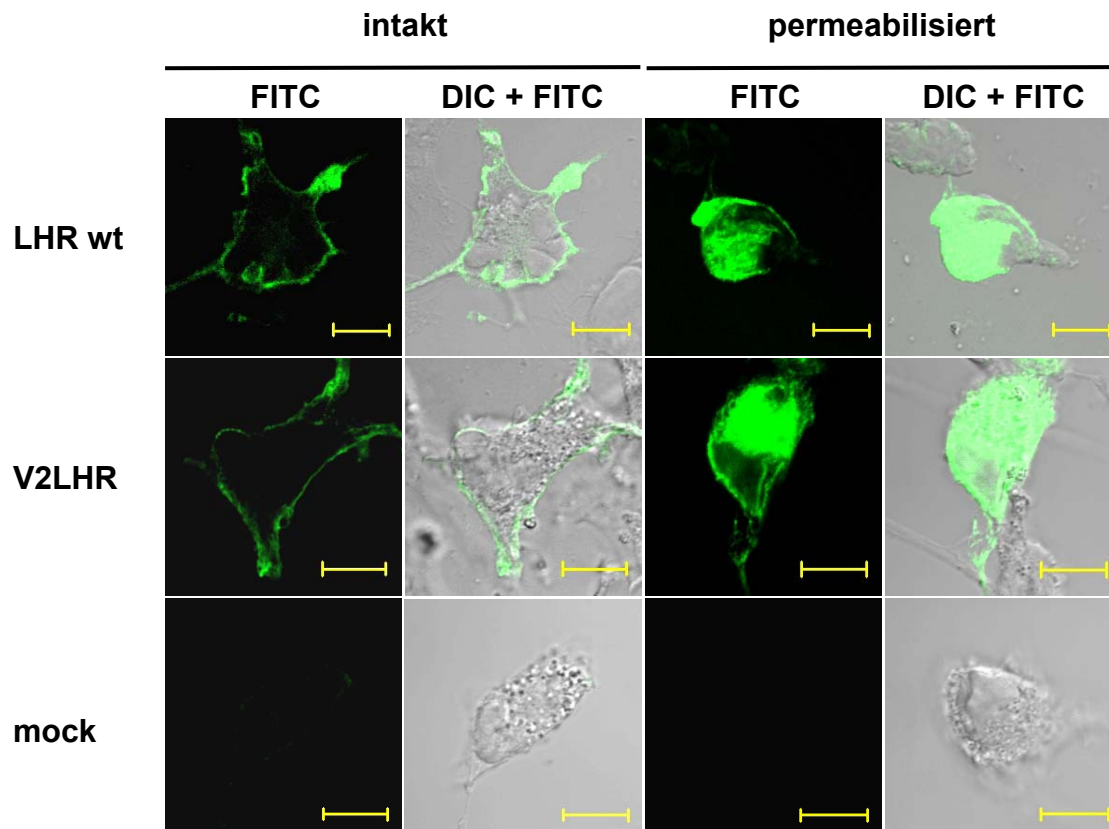


**Abb. 4.1.1. Nachweis der V2LHR-Variante und des Wildtyp-LHR in Membranpräparationen von COS-7-Zellen mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse.**

Die Abbildung zeigt eine charakteristische Western-Blot-Aufnahme von Membranpräparationen aus COS-7-Zellen, die V2LHR oder den Wildtyp-LHR exprimierten. Zum immunologischen Nachweis der Rezeptoren in Gesamtzellmembranpräparationen wurde ein HRP-gekoppelter anti-HA-Antikörper eingesetzt (Kapitel 3.4.5).

Die Versuchsergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen, dass die Einschleusung der cDNA für V2LHR und den Wildtyp-LHR in COS7-Zellen jeweils zur Bildung von Rezeptorproteinen führt, wobei die Rezeptorproteine in die Membranen

der Zellen eingelagert werden. Anhand der Western-Blot-Analyse kann allerdings nicht zwischen Einlagerung der Rezeptoren in der Zelloberflächenmembran und in Membranen der Zellkompartimente unterschieden werden. Der spezifische Nachweis von V2LHR und des Wildtyp-LHR auf der Zelloberfläche von lebenden Zellen sollte in Immunfluoreszenz-Studien erfolgen.



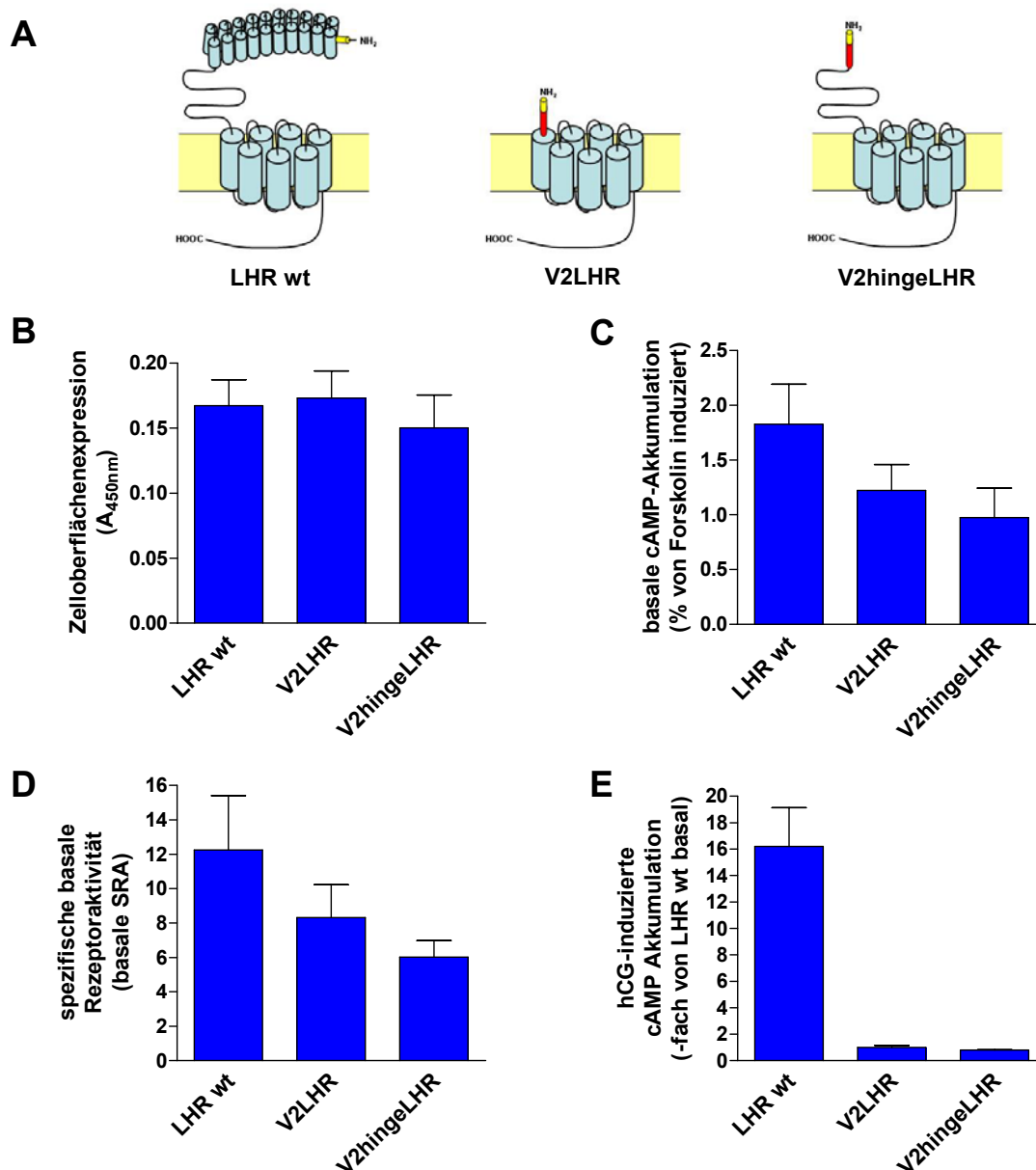
**Abb. 4.1.2. Immunzytologische Untersuchung der Expression und Lokalisation von Wildtyp-LHR und V2LHR-Variante in COS7-Zellen.**

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-LHR und V2LHR in COS7-Zellen wurden, wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Die Detektion der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und im Zellinneren erfolgte mittels eines monoklonalen Ratten-anti-HA-Antikörpers und eines FITC-gekoppelten anti-Ratten-Antikörpers. Aufnahmen der FITC-Fluoreszenz und Überlagerungen der FITC-Aufnahmen mit den entsprechenden „Differential contrast images“ (DIC) sind für jede Variante dargestellt (gelbes Größenmaß: 10 µm). Typische Aufnahmen von zwei unabhängigen Experimenten sind abgebildet.

Die subzelluläre Lokalisation von V2LHR in COS7-Zellen wurde in Immunfluoreszenz-Experimenten untersucht, wobei die Versuchsergebnisse mit denen des Wildtyp-LHR verglichen wurden (Abb. 4.1.2). Als Negativ-Kontrolle für diese Experimente zog man Zellen heran, in die ausschließlich der Leervektor („mock“) eingeschleust wurde. Die Untersuchungen an intakten Zellen zeigten, dass V2LHR

ebenso wie der Wildtyp-Rezeptor auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können. Die Analyse von permeabilisierten Zellen ergab, dass für den Wildtyp-LHR sowie die V2LHR-Variante zahlreiche Rezeptorproteine im Zellinneren identifiziert werden können, die auf eine hohe Anzahl an synthetisierten Rezeptorproteinen schließen lassen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Experimente zeigen demnach, dass die V2LHR-Variante nach Expression in ausreichender Zahl in die Zelloberfläche der COS7-Zellen eingebaut wird. Das komplette Entfernen bzw. partielle Verkürzen der E2D scheint die Proteinexpression und das Zelloberflächen-„Targeting“ des LHR nicht zu beeinträchtigen.

Im nächsten Schritt sollten die Rezeptoraktivitäten der LHR-Varianten untersucht werden. Wenn das Aktivierungsmodell, das für den TSHR postuliert wird, auch für den LHR gelten würde, so müsste die Mutante V2LHR aufgrund des Fehlens der Rezeptoraktivität hemmenden E2D eine hohe hormonunabhängige Aktivität aufweisen. In unseren Versuchen wurden basale Rezeptoraktivitäten von Rezeptoren bestimmt, indem die agonistenunabhängigen Signaltransduktionseigenschaften über den Adenylatzykliaweg untersucht wurden. In cAMP-Akkumulationsassays (Kapitel 3.4.8) wurde die intrazelluläre Konzentration des Second Messengers cAMP in COS-7-Zellen ermittelt, wobei die Zellen entweder V2LHR, V2hingeLHR oder den Wildtyp-LHR exprimierten. Da die intrazelluläre Konzentration des cAMP nicht ausschließlich von den Signaltransduktionseigenschaften des jeweiligen Rezeptors, sondern auch von der Anzahl an funktionsfähigen Rezeptoren an der Zelloberfläche abhängig ist, wurde neben der Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes gleichzeitig die Zelloberflächenexpressionsrate der exprimierten Rezeptoren bestimmt. Dadurch war es möglich, die spezifische basale Rezeptoraktivität (basale SRA) für jede LHR-Variante zu ermitteln, die als Quotient aus cAMP-Gehalt und Zelloberflächenexpressionsrate definiert war (Abb. 4.1.3). Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes der Zellen wurden hierbei nicht die Absolutwerte verwendet, sondern der cAMP-Gehalt prozentual ins Verhältnis zum cAMP-Gehalt nach Maximalstimulation der zellulären Adenylatzyklase mit Forskolin gesetzt (Abb. 4.1.3C). Da der Wert der Maximalstimulation der Adenylatzyklase proportional zur Anzahl an funktionsfähigen Zellen ist, konnten anhand dieser Rechnung Verfälschungen der cAMP-Gehaltsbestimmung durch Unterschiede in der Zelldichte der ausplattierten Zellen vermieden



**Abb. 4.1.3. Funktionelle Charakterisierung von Wildtyp-LHR und N-terminal verkürzten LHR.**

A) Schematische Darstellung des untersuchten Wildtyp-LHR sowie der N-terminal verkürzten LHR-Varianten. Das in die Rezeptoren eingefügte HA-Epitop ist in Gelb dargestellt, die in die verkürzten LHR eingeführte V2R-Sequenz ist rot gekennzeichnet. Hellblaue Bereiche und schwarze Linien markieren die LHR-Sequenz. B) bis D) Um die spezifische basale Rezeptoraktivität (basale SRA; D) jeder verkürzten LHR-Mutante bestimmen und mit der des Wildtyp-LHR vergleichen zu können, wurde für jede LHR-Variante die Zelloberflächenexpressionsrate (B) sowie die rezeptorinduzierte cAMP-Akkumulation in COS7-Zellen ermittelt. B) Die Quantifizierung der Plasmamembraninsertion der einzelnen Varianten erfolgte mittels eines gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Zelloberflächenexpressionsraten sind als Mittelwerte der Absorptionsraten bei 450 nm angegeben. C) Um den Einfluss von Schwankungen in der Zelldichte der ausplattierten Zellen auf die cAMP-Gehaltsbestimmung zu minimieren, wurde der ermittelte cAMP-Gehalt prozentual ins Verhältnis zum cAMP-Gehalt nach Stimulation der jeweils gleich transfizierten Zellen mit 100  $\mu$ M Forskolin gesetzt.

D) Der Quotient aus prozentualem cAMP-Gehalt (% von Forskolin induziert) und Zelloberflächenexpressionsrate stellte die basale SRA jeder Variante dar. E) Zur Ermittlung der agonisteninduzierten Signaltransduktionseigenschaften jeder einzelnen LHR-Variante wurden transfizierte Zellen eine Stunde mit einer 1  $\mu$ molaren hCG-Nährlösung behandelt. Die agonisteninduzierte cAMP-Produktion ist als Vielfaches vom basalen cAMP-Wert der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dar. Zur Bestimmung der basalen SRA wurden zwei bis fünf unabhängige Experimente durchgeführt, zur Ermittlung der agonisteninduzierten cAMP-Akkumulation drei bis sieben unabhängige Experimente. In jedem Versuch erfolgte für jede Variante entweder eine Zweifach- (agonisteninduzierter cAMP-Akkumulationsassay), Dreifach- (agonistenunabhängiger cAMP-Akkumulationsassay) oder Vierfach-Bestimmung (Zelloberflächenexpressions-ELISA).

und kleine Unterschiede im cAMP-Gehalt leichter festgestellt werden.

In Untersuchungen zur basalen Rezeptoraktivität zeigte der Wildtyp-LHR eine SRA von  $12,2 \pm 3,2$  (Abb. 4.1.3D). Interessanterweise waren die SRA von V2LHR und V2hingeLHR im Vergleich zum Wildtyp-LHR nicht erhöht. Die Untersuchungen zeigten vielmehr, dass die basale SRA von V2LHR mit  $8,3 \pm 1,9$  gegenüber der des Wildtyp-LHR um 32% erniedrigt war, die basale SRA von V2hingeLHR ( $6,1 \pm 1,0$ ) war sogar um 50% im Vergleich zur SRA des Wildtyp-LHR reduziert. Das Entfernen der EZD im LHR steigerte demnach nicht die basale Rezeptoraktivität. Ganz im Gegenteil, bei den verkürzten LHR war im Vergleich zum Wildtyp-LHR eine leichte Reduzierung der ligandenunabhängigen Aktivität festzustellen. Diese Beobachtung bestätigt Untersuchungsergebnisse einer früheren Studie zur Aktivität von verkürzten LHR (Sanguhl et al., 2002). Aufgrund der erhobenen Daten kann ausgeschlossen werden, dass die EZD des LHR als intramolekularer inverser Agonist einen inaktiven Rezeptorzustand stabilisiert. Vielmehr scheint die EZD einen positiven Effekt auf die basale Rezeptoraktivität auszuüben.

In weiteren Versuchen wurden die agonisteninduzierten Signaltransduktionseigenschaften der N-terminal verkürzten LHR mit denen des Wildtyp-Rezeptors verglichen. In cAMP-Akkumulationsassays reagierten Wildtyp-LHR-exprimierende Zellen auf Stimulation mit hCG mit einem  $16,2 \pm 2,9$ -fachen cAMP-Anstieg verglichen zum cAMP-Niveau der unbehandelten Zellen (Abb. 4.1.4E). Im Gegensatz dazu reagierten Zellen, die die verkürzten LHR exprimierten, nicht auf eine Hormonstimulation. Die cAMP-Spiegel der V2LHR- ( $1,0 \pm 0,2$ ) und V2hingeLHR-transfizierten Zellen ( $0,8 \pm 0,0$ ) blieben auf dem Niveau der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass insbesondere N-terminale Bereiche der EZD an der Hormonbindung beteiligt sind, ist es nicht verwunderlich, dass V2LHR und V2hingeLHR in Anwesenheit des Hormons keine intrazelluläre Antwort in Form einer

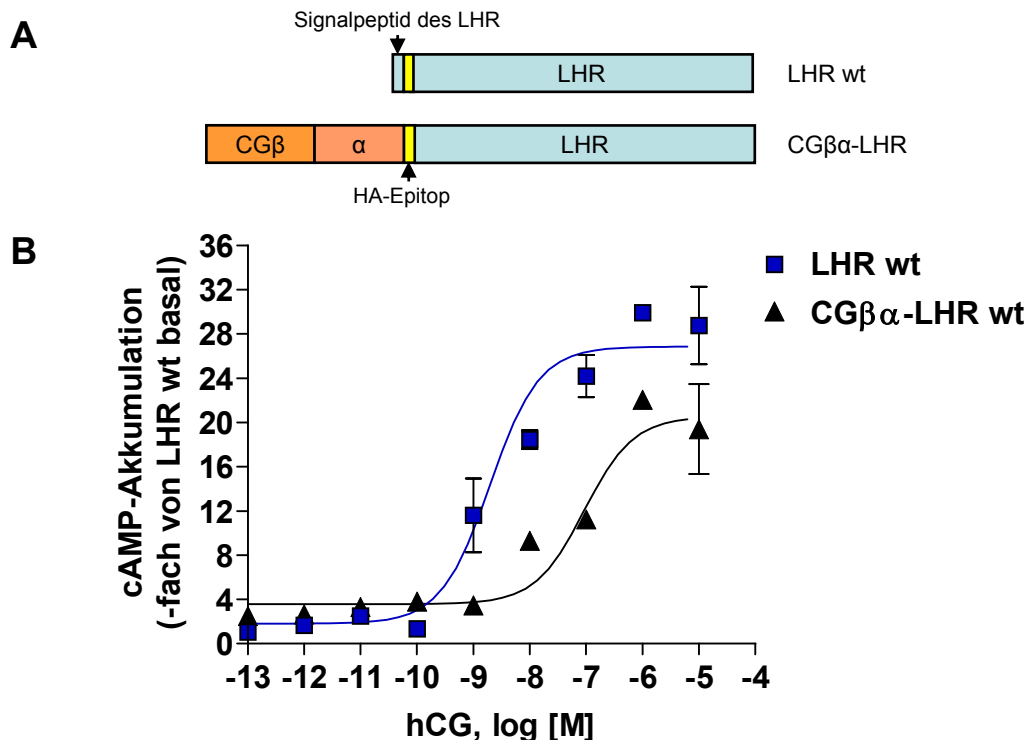
vermehrten cAMP-Produktion auslösen konnten. Diesen Mutanten fehlt der N-terminale Bereich der EZD.

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung von Hormon-Rezeptor-Fusionsproteinen

Der positive Einfluss der EZD auf die ligandenunabhängige Rezeptoraktivität, der sich im vorigen Kapitel angedeutet hat, warf die Frage auf, ob die EZD die agonistenabhängige Rezeptoraktivität ebenfalls positiv beeinflussen würde. Da die N-terminal verkürzten LHR in unserer Studie keine Hormonbindedomäne besaßen, war es verständlich, dass das Hormon nicht an diese Rezeptoren binden und eine vermehrte Aktivität auslösen konnte (Abb. 4.1.3E). Um trotzdem die Bedeutung der EZD für eine ligandenabhängige Rezeptoraktivität dieser LHR außerhalb einer Hormonbindefunktion untersuchen zu können, wurde eine einkettige Variante des hCG kovalent an das N-terminale Ende der verkürzten Rezeptoren (CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR) und des Wildtyp-LHR (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) fusioniert (Abb. 4.2.4A und Tab. 8.1). Wie in Kapitel 1.6 beschrieben worden ist, besteht natives hCG aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, wobei für deren Bildung voneinander getrennte Sequenzen der DNA abgelesen werden müssen. Daher eignet sich die DNA-Sequenz des nativen Hormons nicht zur Bildung eines einkettigen Proteins aus Rezeptor und Hormon. Daher eignen sich ausschließlich DNA-Sequenzen, die für ein einkettiges hCG kodieren, für solche Hormon-Rezeptor-Fusionsproteine. Für diese Arbeit wurde die DNA-Sequenz für ein von Sugahara et al. entwickeltes einkettiges hCG an die Sequenz der LHR-Varianten fusioniert und die daraus resultierenden Hormon-Rezeptor-Varianten funktionell untersucht (Abb. 4.2.4A). Sugahara et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass diese einkettige hCG-Variante die gleiche Wirksamkeit wie das native Hormon besitzt (Sugahara et al., 1995).

Zur Überprüfung der Funktionalität und zur Analyse der agonistenabhängigen Signaltransduktionseigenschaften der CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Variante wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Hierbei wurden COS7-Zellen, die CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt exprimierten, jeweils mit unterschiedlichen Dosen des löslichen, nativen hCG behandelt. Die ermittelten Messwerte wurden mit den Ergebnissen der Zellen verglichen, die den Wildtyp-LHR ohne angebundenem hCG exprimierten. Wie Abb. 4.2.1B zu entnehmen ist, besaß lösliches hCG an CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt eine geringere Effizienz zur Induktion von cAMP in COS7-Zellen als am Wildtyp-LHR, so dass der EC<sub>50</sub>-Wert von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt

( $93 \text{ nM} \pm 0,2$ ) im Vergleich zu LHR wt ( $2,0 \text{ nM} \pm 0,2$ ) ca. um den Faktor 47 erhöht war. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass das angebundene hCG aufgrund einer sterischen Hinderung die Bindung des löslichen hCG an die EZD von  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt erschwert. Allerdings zeigten diese Versuche deutlich, dass  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt trotz angebundenem hCG noch lösliches Hormon binden und danach die Signaltransduktionskaskade über  $G_s$  anschalten kann. In Anbetracht der Tatsache, dass hCG sowie die übrigen Glykoproteinhormone mit einem Molekulargewicht von ca. 30kDa zu den größten Liganden an G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen, ist es erstaunlich, dass die  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt-Variante trotz angebundenem Hormon zusätzlich lösliches hCG binden kann. Da stellt sich die Frage, wie ein Komplex aus Rezeptor, angebundenem hCG und löslichem hCG aussehen mag.



**Abb. 4.2.1. Konzentrations-Wirkungskurven der cAMP-Akkumulation von LHR wt- und  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt-exprimierenden COS7-Zellen.**

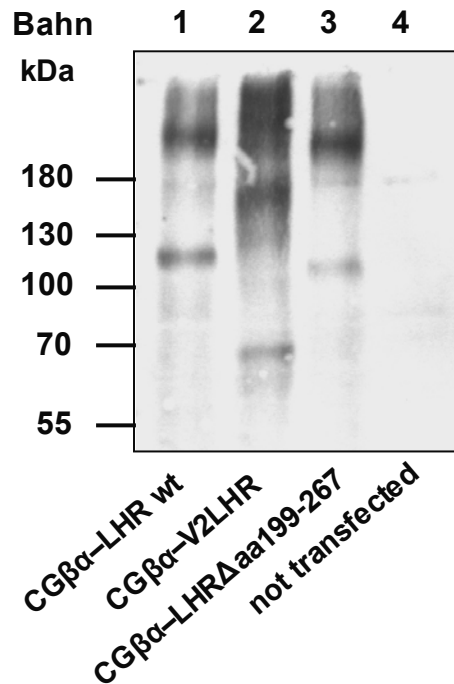
A) Balken-Darstellung von LHR wt und  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt. Die LHR-Sequenz ist hellblau dargestellt, orangefarbene Bereiche markieren das einkettige hCG. Das in die Rezeptoren eingefügte HA-Epitop ist gelb gekennzeichnet. B) COS7-Zellen, die LHR wt oder  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt exprimierten, wurden 1 h mit einer hCG-haltigen Nährlösung unterschiedlicher Konzentration inkubiert und danach hinsichtlich des Gehaltes an intrazellulär gebildetem cAMP untersucht. Die gemessenen cAMP-Werte sind als Vielfaches des basalen cAMP-Wertes der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Alle Zahlenwerte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von fünf unabhängigen Experimenten dar.



Neben der Herstellung von Hormon-Rezeptor-Varianten, die eine N-terminal verkürzte Extrazellulärdomäne aufwiesen (CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR), wurde die Mutante CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR konstruiert (Abb. 4.2.4A und Tab. 8.1). Bei der Erstellung dieser Variante lag die Überlegung zugrunde, dass das angebundene Hormon in CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR aufgrund der extrem verkürzten EZD möglicherweise nicht in Lage sein könnte, mit der Transmembrandomäne in gewohnter Weise zu interagieren. Um eine solche Hinderung zu vermeiden und die freie Beweglichkeit des Hormons zu gewährleisten, war in die CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR-Variante ein Linker zwischen Hormon und Rezeptorsequenz eingefügt worden, sodass die Variante CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR entstand. Im Idealfall sollte diese Linkersequenz keinen Einfluss auf die Konformation von Hormon und Rezeptor nehmen. In unseren Augen war die EZD des humanen LGR7, eines Rezeptors aus der gleichen Subfamilie wie die Glykoproteinhormon-Rezeptoren, geeignet, als Linker dienen. Denn die EZD des humanen LGR7 besitzt im Vergleich zur EZD der Glykoproteinhormon-Rezeptoren eine ähnliche Faltstruktur, unterscheidet sich aber deutlich in seiner Aminosäuresequenz von derjenigen der Glykoproteinhormon-Rezeptoren (Hsu et al., 2000). Daher sollte ein Linker, der aus Bereichen der hLGR7-Extrazellulärdomäne besteht, eine natürliche räumliche Anordnung von Hormon und Rezeptor zueinander zulassen, über die zu den Glykoproteinhormon-Rezeptoren unterschiedliche Aminosäuresequenz aber wenig Einfluss auf den Aktivierungsprozess nehmen. Aminosäuren 108 bis 404 des humanen LGR7, die die LRR-Domäne und die *Hinge Region* des Rezeptors beinhalten, wurden bei der CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR-Variante zwischen dem einkettigen hCG und der Rezeptorsequenz eingefügt. Falls eine arteigene EZD des LHR ausschließlich für die Bindung des Hormons zuständig wäre und das Hormon unabhängig von der Präsenz einer EZD die Transmembrandomäne aktivieren würde, könnte dieser Sachverhalt möglicherweise anhand der CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR-Variante nachgewiesen werden.

Zunächst wurde untersucht, ob alle Hormon-Rezeptor-Varianten in einem heterologen Expressionssystem überhaupt funktional waren, d. h., ob die Transfektion der cDNA dieser Rezeptoren in COS7-Zellen zur Bildung von Proteinen führte, die den Reifeprozess durchliefen und prinzipiell ihre Funktion ausüben konnten. Hierfür zogen wir für Western-Blot-Analysen exemplarisch CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt und CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR heran. In Analogie zu den LHR-Varianten ohne angebundenem hCG wurde zum Nachweis der Hormon-Rezeptor-Mutanten in Western-Blot-Analysen ein HRP-gekoppelter Antikörper eingesetzt, der gegen das in den Rezeptoren vorhandene HA-Epitop gerichtet war. Leider konnten nach Durchführung der Western-Blot-Analyse sowie

Inkubation der Nitrocellulosemembranen mit einer Lösung des anti-HA-Antikörpers keine spezifischen Banden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Es gab mehrere Möglichkeiten, diesen Befund zu erklären. Einerseits konnte die zu geringe Expressionsrate der Hormon-Rezeptor-Varianten an der Zelloberfläche der COS7-Zellen eine Ursache sein, sodass ein Nachweis durch das verwendete Antikörpersystem nicht möglich war. Andererseits bestand die Möglichkeit, dass der genutzte anti-HA-Antikörper aufgrund einer sterischen Hinderung, bedingt durch das anfusionierte hCG, das HA-Epitop der Rezeptoren nicht erkennen konnte. Um eine der zwei Möglichkeiten ausschließen zu können, wurden erneut Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dieses Mal erfolgte die Detektion der Rezeptoren mit einem Antiserum, das gegen die  $\beta$ -Untereinheit des kovalent gebundenen hCG (anti-CG $\beta$ ) gerichtet war, sowie einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. In diesen Versuchen konnten in Gesamtmembranen der mit CG $\beta\alpha$ -LHR wt-DNA transfizierten Zellen ein spezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 115 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.2.2, Bahn 1), das dem Molekulargewicht der glykosylierten Form von CG $\beta\alpha$ -LHR wt entspricht. Eine weitere Bande wurde bei 220 bis 250 kDa identifiziert, bei der es sich um Oligomer-Zusammenlagerungen des CG $\beta\alpha$ -LHR wt-Proteins gehandelt haben dürfte. Die Analysen der Membranen der CG $\beta\alpha$ -V2LHR-exprimierenden Zellen offenbarten eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, welches dem Molekulargewicht von reifem V2LHR plus Hormon entspricht (Abb. 4.2.2, Bahn 2). Zusätzlich konnte eine Bande von etwa 160 kDa identifiziert werden, die eine Oligomer-Anhäufung dieses Hormon-Rezeptor-Proteins dargestellt haben dürfte. Insgesamt konnten diese Western-Blot-Experimente zeigen, dass das genutzte Antikörpersystem aus anti-CG $\beta$ -Antiserum und Sekundärantikörper im Gegensatz zum HRP-gekoppelten anti-HA-Antikörper die Rezeptormoleküle sensitiv und spezifisch erkannte. Darüber hinaus beweisen die Analysen, dass die Einschleusung der cDNA von CG $\beta\alpha$ -V2LHR und CG $\beta\alpha$ -LHR wt in COS7-Zellen zur Bildung von membranständigen Rezeptorproteinen führt. Da die in dieser Form durchgeführte Membranpräparation und Western-Blot-Analyse allerdings keine Aussage hinsichtlich eines ausreichenden Transfers der Hormon-Rezeptor-Proteine an die Zelloberfläche zuließen, wurden Immunfluoreszenz-Experimente (Abb. 4.2.3) und Zelloberflächen-expressions-ELISA (Abb. 4.2.4B und Tab. 8.3) in COS7-Zellen durchgeführt.

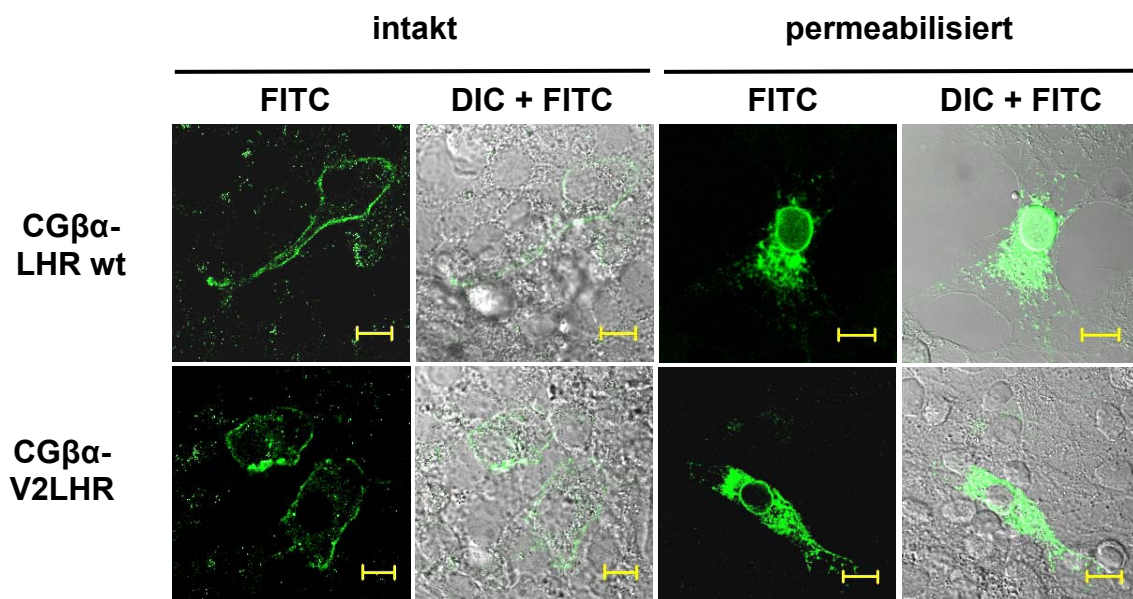


**Abb. 4.2.2. Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von verschiedenen Hormon-Rezeptor-Chimären in COS7-Zellen.**

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben wurden die Gesamtzellmembranpräparationen der LHR-exprimierenden Zellen über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahren ausgewertet. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte mit Hilfe eines gegen die  $\beta$ -Untereinheit des Hormons gerichteten Kaninchen-Antiserums und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Über eine Chemilumineszenzreaktion wurden die detektierten Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

In Analogie zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der LHR ohne angebundenem hCG wurde zur Detektion der Hormon-Rezeptor-Mutanten in der Plasmamembran zunächst ein Antikörpersystem verwendet, das gegen das HA-Epitop der Rezeptorproteine gerichtet war. Entsprechend der Western-Blot-Analysen konnte in Immunfluoreszenz-Experimenten für die Hormon-Rezeptor-Varianten kein bzw. nur ein unzureichendes Signal gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine der Überlegungen war auch hier, dass der anti-HA-Antikörper aufgrund einer sterischen Hinderung durch das angebundene hCG nicht an das HA-Epitop binden konnte. Daher wurden erneut Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt, dieses Mal allerdings unter Verwendung des anti-CG $\beta$ -Antiserums, das sich bei den Western-Blot-Experimenten zum Nachweis der Hormon-Rezeptorproteine bewährt hatte. Zur Visualisierung der durch das anti-CG $\beta$ -Antiserum detektierten Hormon-Rezeptor-Varianten wurde ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundärantikörper genutzt, der die an der Zelloberfläche oder im Zellinneren lokalisierten Rezeptorproteine als ein grünes Fluoreszenzsignal sichtbar machte. An intakten Zellen ließ sich nach Transfektion der

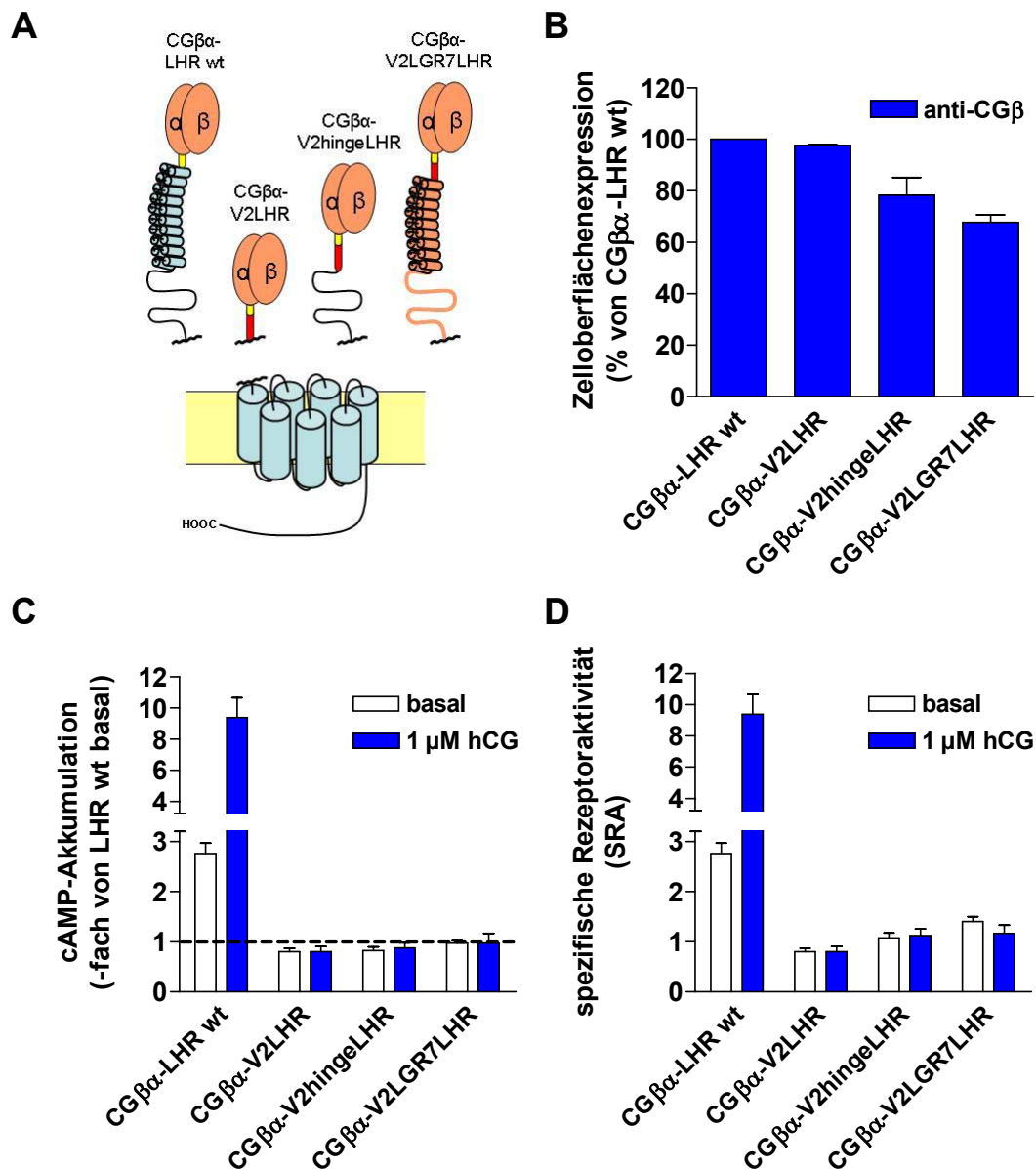
cDNA von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt eine deutliche grüne Fluoreszenz auf der Zelloberfläche nachweisen (Abb. 4.2.3). Nach Permeabilisierung der gleichen Zellen mit Triton-X 100 war neben der grünen Fluoreszenz auf der Zelloberfläche ein stärkeres Signal im Zellinneren zu beobachten. In ähnlicher Weise war für CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR nach heterologer Expression eine deutliche grüne Fluoreszenz in der Plasmamembran festzustellen. Auch in diesen Zellen zeigte sich nach Permeabilisierung darüber hinaus eine intensive Fluoreszenz im Zellinneren.



**Abb. 4.2.3. Subzelluläre Lokalisation von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt und CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR in COS7-Zellen.**

Die Immunfluoreszenz-Studien wurden, wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, an transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Der Nachweis der Hormon-Rezeptor-Varianten erfolgte an intakten und permeabilisierten Zellen mittels eines gegen die Hormon- $\beta$ -Untereinheit der Rezeptormoleküle gerichteten Antikörpers und eines FITC-markierten Sekundärantikörpers. Die Bilder zeigen jeweils FITC-Aufnahmen und die Überlagerung der FITC-Aufnahmen mit den entsprechenden „Differential contrast images“ (DIC) von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt und CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR (gelbes Größenmaß: 10  $\mu$ m). Die Bilder stellen typische Aufnahmen von zwei unabhängigen Experimenten dar.

Zur Quantifizierung der in die Plasmamembran eingelagerten Hormon-Rezeptor-Fusionsproteine wurden Zelloberflächenexpressions-ELISA durchgeführt (Abb. 4.2.4B und Tab. 8.3). In diesen Versuchen waren ausschließlich mit dem gegen die Hormon- $\beta$ -Untereinheit gerichteten Antikörper deutliche Signale für alle Hormon-Rezeptor-Varianten festzustellen. Da für die LH-Rezeptoren ohne angebundenem hCG im Gegensatz dazu ein Antikörpersystem verwendet wurde, das gegen das



**Abb. 4.2.4. Bestimmung der spezifischen Rezeptoraktivität von Hormon-Rezeptor-Varianten.**

A) Schematische Darstellung der untersuchten Hormon-Rezeptor-Varianten. Hellblaue Bereiche und schwarze Linien markieren die LHR-Sequenz. Sequenzen des hLGR7 sind orange gefärbt. Das in die Rezeptoren eingefügte HA-Epitop ist in Gelb dargestellt, die in die verkürzten LHR eingeführte V2R-Sequenz ist rot hervorgehoben. B) bis D) Um die spezifische Rezeptoraktivität (SRA) der Hormon-Rezeptor-Varianten (D) untersuchen zu können, wurden COS7-Zellen, die Hormon-Rezeptor-Varianten exprimierten, hinsichtlich der Zelloberflächenexpressionsrate der Rezeptoren (B) und der cAMP-Akkumulation (C) untersucht. B) Die Zelloberflächenexpressionsrate der Hormon-Rezeptor-Varianten wurde in ELISA-Experimenten mittels eines gegen die Hormon-β-Untereinheit gerichteten Antiserums und eines HRP-markierten Sekundärantikörpers bestimmt. Die gemessenen Signale der Varianten sind ins Verhältnis zum Signal von CGβα-LHR wt gesetzt. C) Basale und agonistenabhängige cAMP-Akkumulation von Hormon-Rezeptor-Varianten exprimierenden Zellen sind als Vielfaches vom basalen cAMP-Gehalt der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale Niveau der

Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. C) Basale und agonistenabhängige SRA jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und rezeptorabhängiger Zelloberflächenexpressionsrate gebildet wurde. Der Messwert der Zelloberflächenexpressionsrate von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt wurde dabei gleich 1 gesetzt. Alle angegebenen Zahlenwerte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei in jedem Versuch pro Rezeptorvariante eine Doppel- (cAMP-Akkumulationsassay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgt ist.

HA-Epitop gerichtet war, konnten die Zelloberflächenexpressionsraten von LHR mit und ohne angebundenem Hormon nicht miteinander verglichen werden. Die Auswertung der Zelloberflächenexpressionssignale der Hormon-Rezeptor-Varianten ergab, dass die Zelloberflächenexpressionsrate von CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR in einem ähnlichen Bereich wie die der CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Variante lag. Zwar war in ELISA-Experimenten für CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR ein deutliches Signal auf der Zelloberfläche festzustellen, allerdings waren die ermittelten Zelloberflächenexpressionsraten dieser Rezeptorvarianten im Vergleich zu CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt um 22% bzw. 32% erniedrigt. Die Untersuchungen zu den Zelloberflächenexpressionseigenschaften konnten demnach zeigen, dass die Hormon-Rezeptor-Fusionproteine tatsächlich in ausreichender Anzahl in die Plasmamembran eingebaut werden und dass das Antikörpersystem ähnlich zu den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse und der Immunfluoreszenz-Experimente die Rezeptormoleküle sensitiv und spezifisch erkannte.

Nach Ermittlung der Zelloberflächenexpressionseigenschaften erfolgte die Untersuchung der basalen und agonisteninduzierten spezifischen Rezeptoraktivität (SRA) der Hormon-Rezeptor-Varianten (Abb. 4.2.4D und Tab. 8.3). Nach Expression von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt in COS7-Zellen war eine erhöhte basale Aktivität (2,8-fach  $\pm$  0,2) festzustellen, die sich durch hCG-Stimulation noch steigern ließ (9,3-fach  $\pm$  1,3). Im Gegensatz dazu konnten für CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR (0,8-fach  $\pm$  0,1) oder CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR (1,1-fach  $\pm$  0,1) keine gesteigerten basalen SRA gemessen werden. Demnach schien das komplette Fehlen der EZD in CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR wie auch die Deletion der N-terminalen Bereiche der EZD in CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR mit einer drastischen Einbuße an basaler Rezeptoraktivität einherzugehen. In Analogie dazu war auch der Austausch der nativen EZD gegen eine als Linkersequenz dienende EZD des hLGR7 in CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR mit einem Verlust an Rezeptoraktivität verbunden. Die SRA dieser Variante war im Vergleich zu CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt um das 2,6-fache erniedrigt. D. h., das angebundene Hormon war ohne die LHR-Extrazellulärdomäne nicht fähig, die Rezeptoraktivität zu steigern. Das fehlende Ansprechen auf die Gabe von löslichem hCG bei CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR, CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR kann damit erklärt werden,

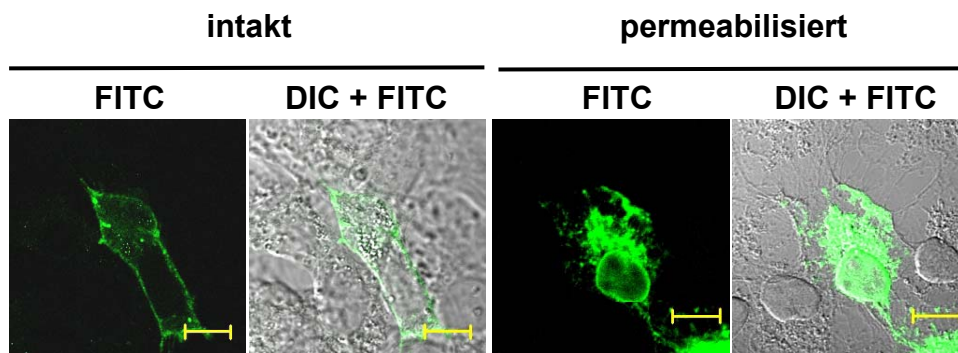
dass diesen Rezeptoren der N-terminale Bereich der EZD fehlt, sodass von diesen Rezeptoren kein für eine ligandeninduzierte Rezeptoraktivierung notwendiges, lösliches Hormon gebunden werden kann.

Zusammengefasst zeigen die Versuche, dass ausschließlich eine intakte native Extrazellulärdomäne eine hormoninduzierte Rezeptoraktivierung gewährleistet. Auch zeigen insbesondere die Daten für die Mutante CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR, dass das Hormon alleine nicht für die Induktion einer aktiven Rezeptorkonformation ausreicht. Ein Verkürzen bzw. Entfernen der EZD ruft eine Konformation der TMD hervor, bei der das Hormon wirkungslos ist.

#### **4.3 Verlust der Signaltransduktionseigenschaften von Hormon-Rezeptor-Varianten nach Deletion von LRR**

Ein herausragendes Merkmal der EZD des LHR und anderer Glykoprotein-hormon-Rezeptoren ist die Präsenz von "leucine-rich repeats" (LRR). In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die aminoterminalen LRR für eine Hormonbindung erforderlich sind (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998; Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Die Berichte bezüglich des Beitrags der C-terminalen LRR zur Hormonbindung werden dagegen kontrovers diskutiert (Braun et al., 1991; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998; Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Falls die C-terminalen LRR nicht an der Bindung des Hormons beteiligt sein sollten, so könnte in ihnen möglicherweise eine Struktur lokalisiert sein, die in Form eines intramolekularen Agonisten eine aktive Konformation der TMD herbeiführt oder zumindest einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung einer solchen Konformation leistet. Diese LRR zu eliminieren und die resultierenden Rezeptoren funktionell zu charakterisieren, ist eine Möglichkeit, Informationen hinsichtlich der Funktion der LRR zu gewinnen. Da allerdings LHR, denen einzelne oder mehrere LRR fehlen, nicht an die Zelloberfläche transferiert und daher nicht funktionell untersucht werden können (Thomas et al., 1996; Sangkuhl et al., 2002), war es bislang nicht möglich, die Rolle der LRR innerhalb der Rezeptoraktivierung auf diese Weise zu untersuchen. Durch Deletion der C-terminalen LRR in dem Hormon-Wildtyp-LHR (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) hofften wir, LRR-Deletionsmutanten generieren zu können, die über eine ausreichende Plasmamembranexpression verfügten und anhand derer man den Einfluss der LRR auf die agonistenabhängige Rezeptoraktivität jenseits einer Hormonbindefunktion untersuchen könnte. Aminosäuren 199 bis 267, die nach

der Nomenklatur von Ascoli et al. LRR 7 bis 9 darstellen, wurden aus CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt entfernt (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267) (Abb. 4.3.2 und Tab. 8.1). In einem späteren Modell der LRR, das anhand der Kristallstruktur aus Hormonbindedomäne der FSHR-EZD und kovalent gebundenem FSH erstellt worden ist, sind in der LRR-Domäne von Glykoproteinrezeptoren zehn LRR lokalisiert, wobei der C-terminale Teil der *Cysteinbox-1* einen zusätzlichen LRR („LRR 0“) darstellt (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Wenn man diese Nomenklatur auf den LHR überträgt, stellen die aus der Mutante CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 entfernten LRR nicht LRR 7 bis 9 dar, sondern LRR 8 bis 10 (siehe Abb. 4.3.2).

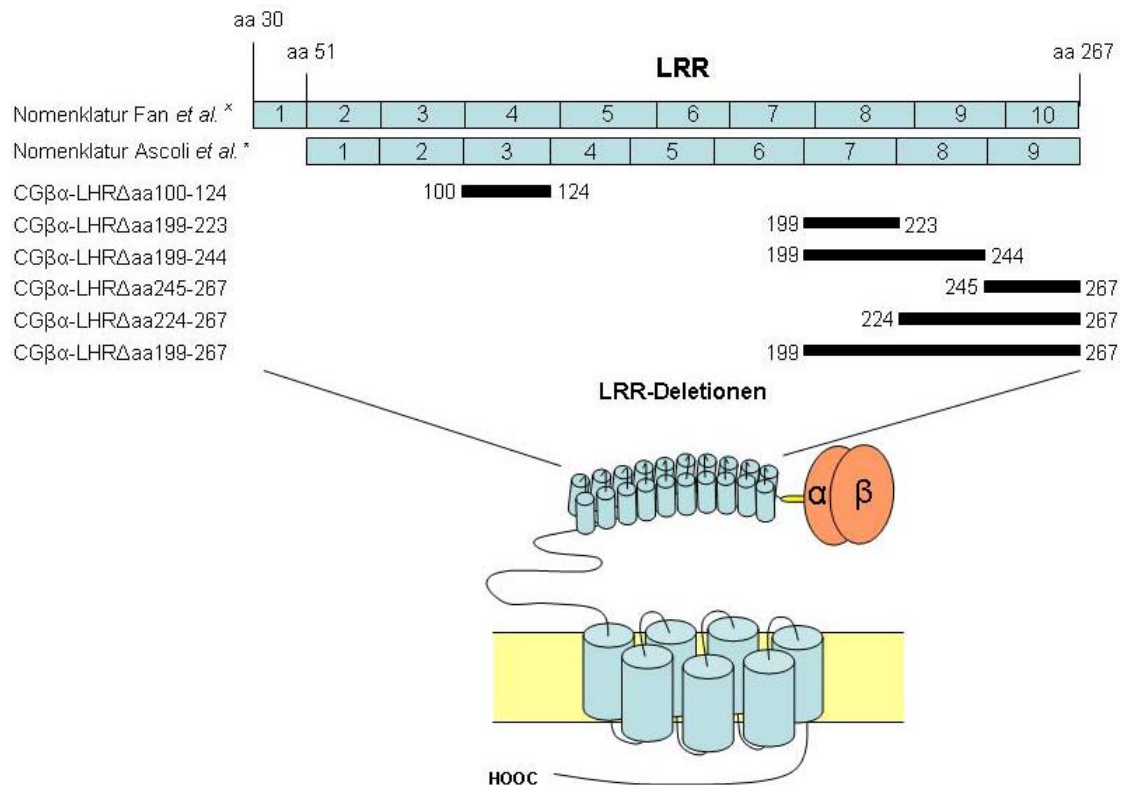


**Abb. 4.3.1. Subzelluläre Lokalisation von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 in COS7-Zellen.**

Die Immunfluoreszenz-Studien wurden, wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, an transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 erfolgte an intakten und permeabilisierten Zellen mittels eines gegen die Hormon- $\beta$ -Untereinheit gerichteten Antiserums des Rezeptors und eines FITC-markierten Sekundärantikörpers. FITC-Aufnahmen und Überlagerungen der FITC-Bilder mit den entsprechenden „Differential contrast images“ (DIC) sind dargestellt (gelbes Größenmaß: 10  $\mu$ m). Die Bilder repräsentieren typische Aufnahmen von zwei unabhängigen Experimenten.

Zunächst überprüften wir die Expressionseigenschaften und die intrazelluläre Lokalisation von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 in COS7-Zellen. In Western-Blot-Analysen konnten in Gesamtzellmembranen von COS7-Zellen nach Transfektion ein spezifisches Protein von ca. 110 kDa nachgewiesen werden, das dem Molekulargewicht der glykosylierten Form von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 entspricht





**Abb. 4.3.2. Schematische Darstellung der untersuchten CGβα-LHR-Deletionsmutanten.**

Die Abbildung zeigt die in dieser Arbeit untersuchten CGβα-LHR-Deletionsmutanten sowie die Bereiche in der LRR-Domäne, die der jeweiligen Hormon-Rezeptor-Variante entfernt wurden. Nach der Nomenklatur von Fan und Hendrickson kann die LRR-Domäne in zehn ungleichmäßige LRR unterteilt werden, wobei innerhalb des N-terminalen, cysteinreichen Bereiches der EZD die erste LRR lokalisiert ist (\*; Fan & Hendrickson, 2005; 1. Balken von oben). Nach einer älteren Nomenklatur von Ascoli *et al.* wurde die hormonbindende Domäne dagegen in neun LRR eingeteilt, wobei die erste LRR bei aa 51 des hLHR beginnt (\* Ascoli *et al.*, 2002; 2. Balken von oben). Die schwarzen Balken kennzeichnen den Bereich der LRR-Domäne, welcher der jeweiligen Rezeptor-Variante entfernt wurde. Die Zahlenwerte neben den schwarzen Balken bezeichnen die erste und letzte entfernte Aminosäure.

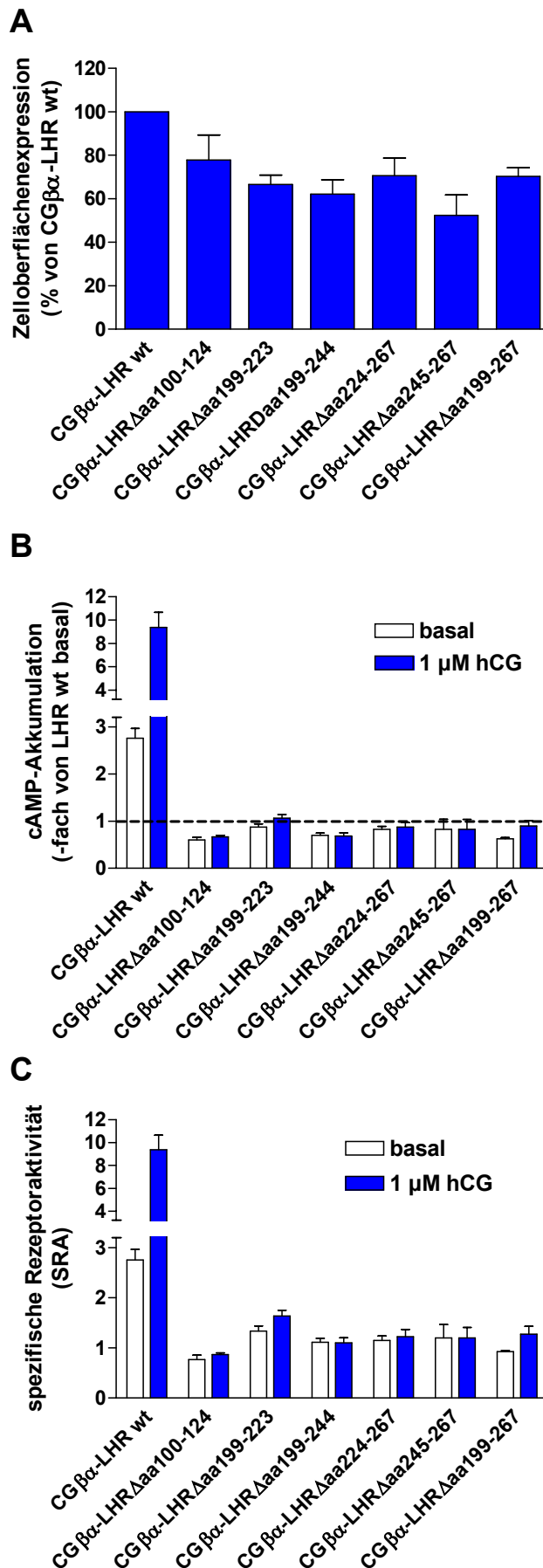
(Abb. 4.2.2, Bahn 3). Zusätzlich wurde eine diffuse Bande >180 kDa identifiziert, die eine Oligomer-Ansammlung des Rezeptorproteins darstellen könnte. Somit konnte in COS7-Zellen nach Einschleusung der cDNA für CGβα-LHRΔaa199-267 die Bildung von entsprechenden Rezeptorproteinen nachgewiesen werden.

Die intrazelluläre Lokalisation von CGβα-LHRΔaa199-267 überprüften wir in Immunfluoreszenz-Experimenten. Ähnlich zu CGβα-LHR wt (Abb. 4.2.3) konnte für CGβα-LHRΔaa199-267 an intakten Zellen eine intensive grüne Fluoreszenz an der Zelloberfläche festgestellt werden, welche die subzelluläre Lokalisation der CGβα-LHRΔaa199-267-Proteine in transfizierten Zellen anzeigte (Abb. 4.3.1). An

permeabilisierten Zellen ließ sich neben dem Signal auf der Zelloberfläche zusätzlich ein starkes Fluoreszenzsignal im Zellinneren nachweisen.

Eine quantitative Analyse der Zelloberflächenexpressionsrate in ELISA-Versuchen ergab, dass im Vergleich zu CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt 30% weniger CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267-Proteine in die Zelloberfläche inseriert werden (Abb. 4.3.3A). In cAMP-Akkumulationsassays induzierte CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 in COS7-Zellen weder unter basalen Bedingungen, noch in Anwesenheit von freiem hCG erhöhte cAMP-Spiegel (Abb. 4.3.3B). Daher war für CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267 keine erhöhte SRA zu verzeichnen (Abb. 4.3.3C). Dieses Ergebnis nährte unsere Hypothese, dass möglicherweise eine agonistische Struktur zwischen Aminosäure 199 und 267 zu finden sei und dass demzufolge ein Entfernen dieser Region in LHR einen inaktiven Rezeptor hervorrufen würde. Aufgrund dieser Annahme versuchten wir diese agonistische Struktur einzugrenzen, indem wir verschiedene Bereiche innerhalb der Aminosäuren 199 bis 267 von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt entfernten (Abb. 4.3.2 und Tab. 8.1). Um mögliche funktionelle Unterschiede zwischen den N- und C-terminalen LRR aufzeigen zu können, stellten wir darüber hinaus eine Hormon-Rezeptor-Mutante (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124) her, der die Aminosäuren 100 bis 124 fehlte (Abb. 4.3.2 und Tab. 8.1). Die Aminosäuren 100 bis 124 liegen inmitten der N-terminalen LRR-Region, die in mehreren Studien als Hormonbindedomäne identifiziert werden konnte (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998; Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Bei CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124 sollte daher im Gegensatz zu den anderen Deletionsmutanten die Bindung von freiem hCG eingeschränkt und die agonisteninduzierte Rezeptoraktivierung reduziert sein.

Eine Analyse der Zelloberflächenexpressionseigenschaften in COS7-Zellen ergab, dass die Plasmamembraninsertionsrate aller Hormon-Rezeptor-Deletionsmutanten im Vergleich zu derjenigen von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt zwischen 22% und 48% erniedrigt war (Abb. 4.3.3A und Tab. 8.3). In cAMP-Akkumulationsassays war für keine der Hormon-Rezeptor-Deletionsmutanten eine Anschaltung der cAMP-Produktion in COS7-Zellen zu verzeichnen, weder unter basalen Bedingungen noch in Anwesenheit von freiem hCG (Abb. 4.3.3B und Tab. 8.3). Es konnten demnach keine erhöhten SRA der Mutanten registriert werden (Abb. 4.3.3C und Tab. 8.3). Diese Ergebnisse konnten mehrere Ursachen haben: 1) Das Entfernen der LRR resultiert in einer Missfaltung des Rezeptors, wodurch die EZD nicht in der Lage ist, das



**Abb. 4.3.3. Bestimmung der SRA von Hormon-Rezeptor-Varianten mit LRR-Deletionen.**

Um die spezifische Rezeptoraktivität (SRA) der Hormon-Rezeptor-Varianten mit LRR-Deletionen untersuchen zu können, wurden COS7-Zellen, die die jeweilige Hormon-Rezeptor-Variante exprimierten, hinsichtlich Zelloberflächenexpression der Rezeptoren (A) und cAMP-Akkumulation (B) untersucht. A) Die Zelloberflächenexpressionsrate der Hormon-Rezeptor-Varianten wurde in ELISA-Experimenten mittels eines gegen die Hormon-β-Untereinheit gerichteten Antiserums bestimmt. Die gemessenen Signale der Varianten sind als Prozent des Signals von CGβα-LHR wt angegeben. B) Basale und agonisten-abhängige cAMP-Akkumulationen sind als Vielfaches des Basal-Wertes der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale cAMP-Niveau der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. C) Basale und agonistenabhängige spezifische Rezeptoraktivitäten (SRA) jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und rezeptorabhängiger Zelloberflächenexpression gebildet wurde. Der Messwert der Oberflächenexpression von CGβα-LHR wt wurde dabei gleich 1 gesetzt und die Oberflächenexpressionswerte der übrigen LHR-Varianten umgerechnet. Alle angegebenen Zahlenwerte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei in jedem Versuch pro Variante eine Doppel- (cAMP-Akkumulations-assay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgt ist.

gebundene Hormon in eine räumliche Nähe zur TMD zu bringen und eine Interaktion zwischen Hormon und TMD zu ermöglichen. 2) Die durch das Entfernen der LRR ausgelöste Fehlfaltung der EZD bzw. des Rezeptors führt zu keiner Interaktion zwischen EZD und TMD sowie Hormon und TMD, wobei beide Interaktionen für eine aktive Rezeptorkonformation notwendig sind. 3) In der EZD ist eine agonistische Struktur lokalisiert, allerdings bedingt die Deletion von LRR eine Fehlfaltung der EZD bzw. des gesamten Rezeptors, sodass die agonistische Struktur nicht mit der TMD interagieren kann. 4) In der EZD ist keine lineare Struktur lokalisiert, die als intramolekularer Agonist fungiert, sondern multiple, in unterschiedlichen EZD-Regionen lokalisierte Strukturen sind gemeinsam für die agonistische Eigenschaft der EZD verantwortlich.

Leider bieten unsere Untersuchungsergebnisse keine Anhaltspunkte für eine der genannten Hypothesen. Die Versuchsergebnisse konnten allerdings zeigen, dass kein zusammenhängender Bereich innerhalb der LRR identifiziert werden kann, der als endogener Agonist auf die TMD wirkt. Die Versuchsergebnisse bestätigen darüber hinaus die Beobachtungen aus vorangegangenen Experimenten, dass eine intakte EZD für eine ligandeninduzierte, aktive Rezeptorkonformation des LHR notwendig ist.

#### **4.4 Funktionelle Charakterisierung von LHR-Varianten mit unterschiedlichen Extrazellulärdomänen**

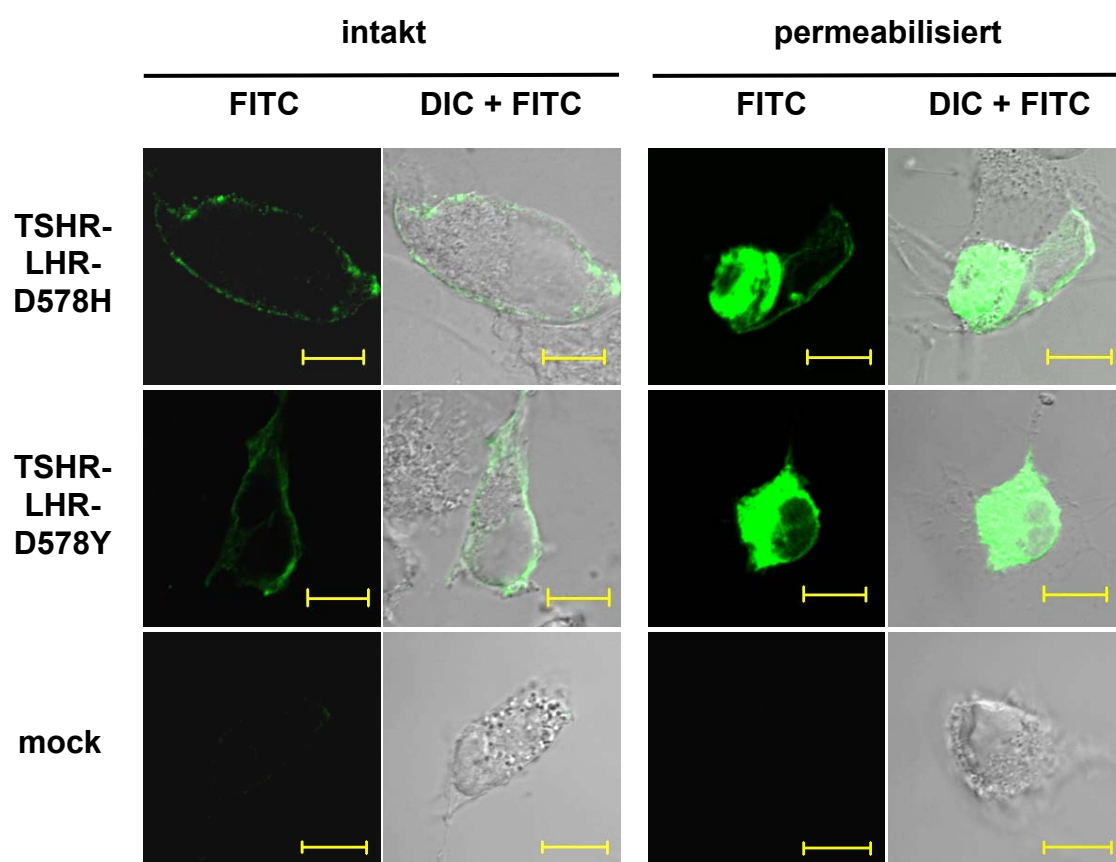
In weiteren Untersuchungen versuchten wir, die bisherigen Ergebnisse bezüglich einer Verringerung der ligandenunabhängigen Rezeptoraktivität durch Deletion der Extrazellulärdomäne zu bestätigen. Da allerdings die basale Rezeptoraktivität des LHR im Vergleich z. B. zum TSHR sehr niedrig ist, ist es mitunter schwierig, kleine, durch Modifikationen des LHR hervorgerufene Unterschiede in den Signaltransduktions-eigenschaften nachzuweisen. Aus diesem Grund haben wir natürlich vorkommende, aktivierende LHR-Mutationen genutzt. Sie haben die Eigenschaft, im Wildtyp-LHR eine ausgeprägte aktive Konformation zu induzieren und somit eine starke agonistenunabhängige Rezeptoraktivität hervorzurufen. Ein negativer Einfluss auf eine aktive Rezeptorkonformation durch Modifikation der EZD sollte daher in LHR, die aktivierende Rezeptormutationen enthalten, zu einer deutlichen Erniedrigung der Rezeptoraktivität führen. Vier unterschiedliche Punktmutationen, die Aminosäureaustausche bewirken (L457R in TMD-3, D564G in IL-3, D578H und D578Y

in TMD-6), wurden in den Wildtyp-LHR und die verkürzte Variante V2LHR eingefügt und deren Effekt in diesen Rezeptoren untersucht (Abb. 4.4.2A und Tab. 8.2).

ELISA-Experimente verrieten, dass mit Ausnahme der D564G-Mutation nach Einfügen der aktivierenden Mutationen eine deutlich erhöhte Zelloberflächenexpressionsrate gegenüber dem Wildtyp-LHR zu verzeichnen gewesen ist (Abb. 4.3.2B und Tab. 8.2). In der V2LHR-Variante dagegen hatte das Einfügen von einer der aktivierenden Mutationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelloberflächenexpression des V2LHR. Während die L457R- und D564G-Mutation zu V2LHR-Varianten führten, die im Vergleich zum Wildtyp-LHR um 47% bzw. 40% geringer an der Zelloberfläche exprimiert wurden, forcierte die D578H-Mutation das Trafficking des V2LHR an die Zelloberfläche, sodass die Variante V2LHR-D578Y eine um 30% höhere Expressionsrate im Vergleich zu LHR wt aufwies. V2LHR-D578H wurde im gleichen Rahmen wie der Wildtyp-LHR an der Zelloberfläche detektiert.

Bestimmungen der Signaltransduktionseigenschaften in cAMP-Akkumulationsassays sowie der Zelloberflächenexpressionsrate der generierten LHR-Varianten ergaben, dass alle Mutationen wie in der Literatur beschrieben im Wildtyp-LHR eine deutliche konstitutive Rezeptoraktivität hervorrufen (Abb. 4.4.2C und Tab. 8.2). In unseren Versuchen konnten wir für LHR, die eine der genannten aktivierenden Mutationen enthielten, SRA von 6,7 bis 26,8 ermitteln. Im Gegensatz dazu war nur eine Mutation (D578H) fähig, eine hohe agonistenunabhängige SRA in der V2LHR-Variante auszulösen (V2LHR-D578H:  $SRA = 8,4 \pm 0,6$ ). Nach Entfernen der EZD im LHR war der Effekt der Mutationen L457R, D564G und D578Y auf die Rezeptoraktivität stark abgeschwächt oder ausgelöscht. Die basale SRA der V2LHR-Variante mit L457R-Mutation (V2LHR-L457R) war um über 50% gegenüber der SRA des Wildtyp-LHR mit der gleichen Mutation erniedrigt. Mit einer SRA von 4,2 zeigte V2LHR-L457R allerdings noch eine deutliche basale Rezeptoraktivität. Darüber hinaus besaßen V2LHR-D564G und V2LHR-D578Y basale SRA, die nur 6,3 % bzw. 22,4% des SRA-Niveaus der jeweiligen Wildtyp-Variante entsprachen. Obwohl drei der vier natürlichen aktivierenden Mutationen in der V2LHR-Mutante keinen oder einen stark abgeschwächten Effekt zeigten, war die vierte Mutation D578H doch ein Beweis dafür, dass die V2LHR-Variante prinzipiell zu einer vermehrten G-Proteinkopplung fähig ist. Eine Fehlfaltung der V2LHR-Variante aufgrund der Modifikation der EZD kann daher nicht als Ursache für die drastische Einbuße der Signaltransduktionseigenschaften angesehen werden. Allerdings zeigten die Untersuchungen deutlich, dass V2LHR nicht so effektiv wie der Wildtyp-LHR durch Punktmutationen in der TMD aktiviert werden

kann. Dies lässt vermuten, dass die EZD des LHR, die in der V2LHR-Variante fehlt, eine bestimmte Konformation der TMD unterstützt, und zwar eine Art Präkonformation, in der aktivierende Mutationen leichter einen ausgeprägten aktiven Rezeptorzustand induzieren können. Die Ergebnisse bestätigen die ersten in dieser Arbeit erhobenen Daten hinsichtlich eines positiven Einflusses der LHR-EZD auf die ligandenunabhängige Rezeptoraktivität. Eine Funktion der LHR-EZD als inverser Agonist für die TMD, die für die EZD des TSHR postuliert wird, kann daher ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.4.1. Immunzytologische Untersuchung der Lokalisation von TSHR-LHR-Chimären in COS7-Zellen.**

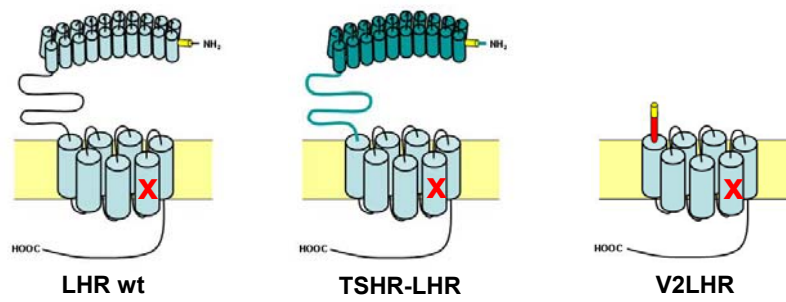
Zur Visualisierung der TSHR-LHR-Varianten in COS7-Zellen wurden, wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt. Nach Transfektion und Fixierung wurden intakte und permeabilisierte COS7-Zellen mit einem Ratten-anti-HA-Antikörper und einem FITC-konjugierten anti-Ratten-Antikörper behandelt. Aufnahmen der FITC-Fluoreszenz und Überlagerungen der FITC-Aufnahmen mit den jeweiligen „Differential contrast images“ (DIC) sind für jede Variante dargestellt (gelbes Größenmaß 10 µm). Typische Aufnahmen von zwei unabhängigen Versuchen sind abgebildet.

Die Versuchsergebnisse zur V2LHR-Variante warfen die Frage auf, ob ausschließlich die native LHR-EZD den Effekt natürlich vorkommender, aktivierender

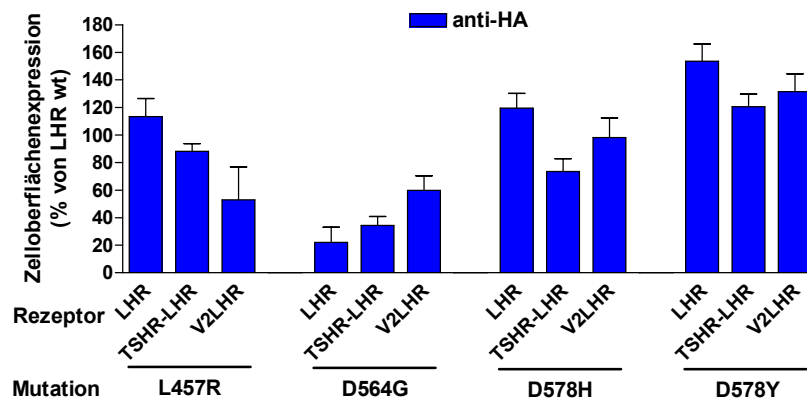
TMD-Mutationen unterstützen würde oder ob die EZD eines anderen Glykoprotein-hormon-Rezeptors ebenfalls eine solche Wirkung auf die TMD des LHR ausüben könnte. In diesem Zusammenhang interessierte uns auch, ob die EZD des TSHR einen hemmenden Effekt auf aktivierende TMD-Mutationen des LHR zeigen und daher eine inaktive Rezeptorkonformation induzieren würde. In der Literatur ist beschrieben worden, dass die TSHR-EZD in Abwesenheit des Hormons als inverser Agonist eine aktive TSHR-Konformation verhindern soll. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die TSHR-EZD (Aminosäuren 1 bis 413 des hTSHR) mit der Transmembrandomäne des LHR, welche die jeweilige aktivierende Mutation enthielt, fusioniert (Abb. 4.4.2A und Tab. 8.1). Ferner wurde ein TSHR-LHR-Rezeptor (TSHR-LHR) generiert, der keine aktivierende Mutation enthielt. Zwei der TSHR-LHR-Varianten mit aktivierender Mutation (TSHR-LHR-D578H und -D578Y) wurden in Immunfluoreszenz-Experimenten hinsichtlich subzellulärer Lokalisation untersucht.

Nach Expression von TSHR-LHR-D578H und TSHR-LHR-D578Y war an intakten COS7-Zellen eine grüne Fluoreszenz auf der Zelloberfläche zu beobachten, die den Einbau der Rezeptor-Chimären in die Plasmamembran anzeigte (Abb. 4.4.1). Obwohl der Wildtyp-TSHR über eine 5-fach höhere Zelloberflächenexpressionsrate als der Wildtyp-LHR verfügt (Tab. 8.2), war in ELISA-Experimenten nach Fusion der TSHR-EZD an die LHR-EZD (TSHR-LHR) keine im Vergleich zum Wildtyp-LHR erhöhte Plasmamembraninsertionsrate zu verzeichnen. Die Präsenz der TSHR-EZD in TSHR-LHR führte demnach zu keiner gesteigerten Expressionsrate. Vergleicht man die TSHR-LHR-Varianten untereinander, so sind große Unterschiede im Zellmembran-„Trafficking“ festzustellen. Beispielsweise war die Oberflächenexpressionsrate der Variante TSHR-LHR-D564G im Vergleich zur Expressionsrate von LHR wt erniedrigt, wohingegen die Oberflächenexpressionsrate der TSHR-LHR-D578Y-Variante gegenüber derjenigen des Wildtyp-LHR um 22% erhöht gewesen ist (Abb. 4.4.2B und Tab. 8.2). Vergleicht man Wildtyp-LHR und TSHR-LHR-Chimäre mit jeweils derselben aktivierenden Mutation miteinander, so ist festzustellen, dass die Wildtyp-LHR-Varianten ein stärkeres Membran-„Trafficking“ aufweisen als die entsprechenden TSHR-LHR-Varianten. Eine Ausnahme hierbei bildet TSHR-LHR-D564G, diese Variante wird an der Oberfläche stärker exprimiert als LHR-D564G.

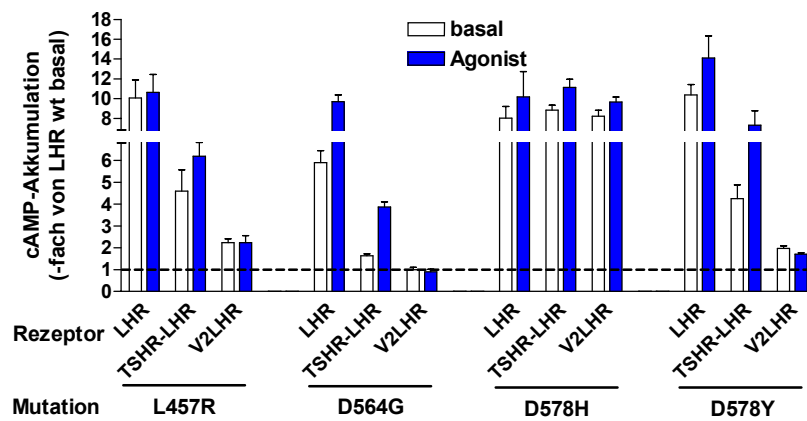
**A**



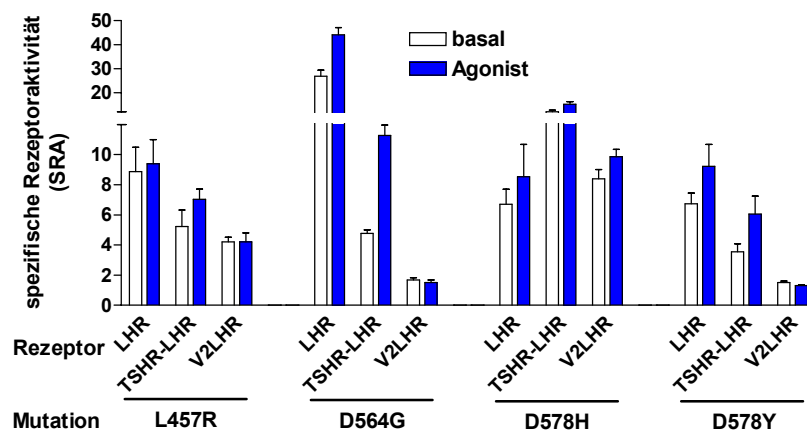
**B**



**C**



**D**





**Abb. 4.4.2 (siehe Seite 73). Bestimmung der SRA verschiedener LHR-Varianten mit aktivierenden Mutationen.**

A) Schematische Darstellung der untersuchten LHR-Varianten mit aktivierenden Mutationen. Hellblaue Bereiche und schwarze Linien markieren die LHR-Sequenz. Die in einige LHR-Varianten eingefügte hTSHR-Sequenz ist grün gefärbt. Das in die LHR eingefügte HA-Epitop ist in Gelb dargestellt, die in die verkürzten LHR eingeführte V2R-Sequenz rot hervorgehoben. Das rote X markiert die in die Rezeptoren eingefügte aktivierende Mutation. B) bis D) Die spezifischen Rezeptoraktivitäten (SRA) (D) der modifizierten Rezeptorvarianten wurden über die Bestimmung der rezeptorabhängigen cAMP-Produktion (B) und der Zelloberflächenexpressionsrate (A) in COS7-Zellen ermittelt. A) Die Zelloberflächenexpressionsrate der Rezeptoren wurde in ELISA-Experimenten mittels eines gegen das HA-Epitop der Rezeptoren gerichteten Antikörpersystems bestimmt. Die gemessenen Signale der Varianten sind als Prozent des Signals von Wildtyp-LHR angegeben. B) Basale und agonistenabhängige cAMP-Akkumulationen sind als Vielfaches vom basalen Wert der Wildtyp-LHR exprimierenden Zellen angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale cAMP-Niveau der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. Zur Ermittlung der ligandenabhängigen SRA wurden Zellen, die LHR- und V2LHR-Varianten exprimierten, mit einer 1  $\mu$ molaren hCG-Nährlösung inkubiert, wohingegen TSHR-LHR-Chimären exprimierende Zellen mit einer 100 mU/ml bTSH-haltigen Nährlösung behandelt wurden. C) Basale und agonistenabhängige SRA jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und rezeptorabhängiger Zelloberflächenexpressionsrate gebildet wurde. Der Messwert der Oberflächenexpressionsrate von LHR wt wurde dabei gleich 1 gesetzt und die Expressionsraten der übrigen Rezeptoren entsprechend umgerechnet. Alle angegebenen Zahlenwerte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei in jedem Versuch pro Variante eine Doppel- (cAMP-Akkumulationsassay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgt ist.

In früheren Untersuchungen von ähnlichen TSHR-LHR-Fusionsrezeptoren konnte gezeigt werden, dass die TSHR-EZD von solchen Rezeptorchimären das Hormon TSH binden und anschließend eine vermehrte, hormonabhängige G-Proteinkopplung über die fremde Transmembrandomäne ausgelöst werden kann (Braun et al., 1991). Unsere Untersuchungen konnten diese Beobachtungen bestätigen, denn auch in unseren Versuchen induzierten alle TSHR-LHR-Konstrukte nach Stimulation mit bTSH in COS7-Zellen eine deutliche Erhöhung des cAMP-Spiegels um das 4- bis 11-fache des Basal-Wertes der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen (Abb. 4.4.2C und Tab. 8.2). Die deutliche Antwort der TSHR-LHR-Varianten auf die Stimulation mit TSH zeigte uns, dass diese künstlichen Rezeptoren keine Fehlfaltung aufweisen, sondern – wie in der Literatur beschrieben – funktionstüchtig sind. Somit konnten wir uns den basalen Signaltransduktions-eigenschaften dieser Varianten zuwenden.

Alle TSHR-LHR-Varianten mit aktivierender Mutation wiesen eine deutlich erhöhte basale SRA auf (Abb. 4.4.2D und Tab. 8.2). Die SRA dieser TSHR-LHR-Varianten war um das 3,5- bis 12-fache gegenüber der basalen SRA des Wildtyp-LHR

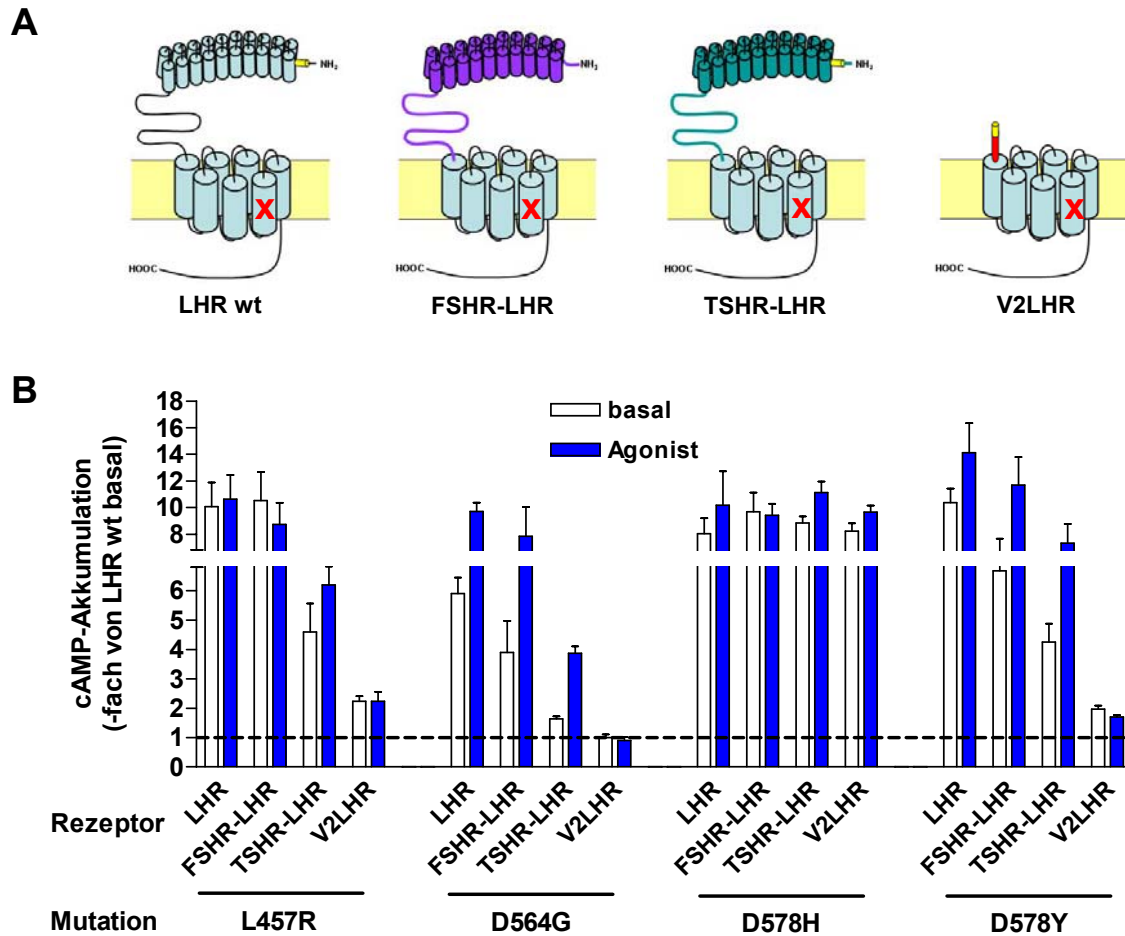
erhöht. Ein Vergleich von LHR- und TSHR-LHR-Varianten mit jeweils der gleichen aktivierenden Mutation zeigte allerdings, dass die SRA der TSHR-LHR-Chimären deutlich unter der SRA der jeweiligen LHR-Variante mit nativer EZD lagen. Eine Ausnahme hierbei bildete TSHR-LHR-D578H. Dieser Rezeptor zeigte eine höhere basale SRA als LHR-D578H. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die TSHR-EZD nach Bindung von TSH eine agonisteninduzierte Signaltransduktion über die LHR-TMD auszulösen kann. Die TSHR-EZD ist im Gegensatz zur LHR-EZD allerdings nicht in der Lage, eine Konformation der LHR-TMD zu induzieren, in der alle beschriebenen aktivierenden LHR-Mutationen zur vollen Entfaltung kommen können. Dennoch lässt die TSHR-EZD eine Restaktivität der in den Transmembranhelices lokalisierten aktivierenden Mutationen zu.

In einer nächsten Überlegung fragten wir uns, welchen Einfluss die EZD des dritten Glykoproteinrezeptors, des FSHR, auf die TMD des LHR ausüben würde. Würde die FSHR-EZD entsprechend zur nativen LHR-EZD eine aktive Transmembrandomäne des LHR unterstützen oder ähnlich wie die EZD des TSHR nur partiell die Aktivität von aktivierenden LHR-Mutationen unterstützen. Chimären, welche die EZD des FSHR und die TMD des LHR enthielten, wurden hergestellt und mit den vier zuvor beschriebenen aktivierenden LHR-Mutationen versehen. In Analogie zu den schon untersuchten Rezeptoren wurde ein HA-Epitop in alle FSHR-LHR-Varianten eingefügt, um in einem heterologen Expressionssystem eine immunologische Detektion dieser Chimären durchführen zu können. Aufgrund von eigenen Sequenzanalysen sowie publizierter Sequenzvergleiche von verschiedenen Glykoproteinrezeptoren (Kumar & Trant, 2001) konnte die Position des Signalpeptids in der Sequenz des humanen FSHR lokalisiert werden. Aminosäuren 1 bis 17 in der Sequenz des hFSHR bilden nach den Analysen das Signalpeptid. Danach beginnt im hFSHR die *Cysteinebox-1*, gefolgt von der LRR-Domäne. Um möglichst eine Fehlfaltung der FSHR-EZD zu vermeiden und eine physiologische Funktion nicht zu beeinträchtigen, wurde das HA-Epitop nach der 17. Aminosäure in die hFSHR-Sequenz eingefügt. Die generierten HA-FSHR-LHR-Varianten (Tab. 8.1) wurden hinsichtlich ihrer Signaltransduktionseigenschaften untersucht.

In cAMP-Akkumulationsassays konnten für COS7-Zellen, die mit cDNA für FSHR-LHR-Chimären behandelt worden waren, ausschließlich extrem niedrige basale cAMP-Spiegel gemessen werden (Tab. 8.2). Darüber hinaus war nach FSH-Stimulation der transfizierten Zellen kein Anstieg des cAMP-Spiegels zu verzeichnen. In ELISA-Experimenten konnten keine rezeptorspezifischen Zelloberflächenexpressions-

signale für die FSHR-LHR-Chimären detektiert werden (Tab. 8.2). Vermutlich wurden nach Transfektion der COS7-Zellen mit der cDNA für diese Rezeptorchimären keine funktionstüchtigen Rezeptorproteine gebildet bzw. die Rezeptorproteine nicht an die Zelloberfläche transferiert. Nun stellte sich die Frage, ob das Einfügen des HA-Epitops ausschließlich bei den FSHR-LHR-Varianten zu funktionsuntüchtigen Rezeptoren führen würde und ob ein HA-Epitop an entsprechender Position auch im Wildtyp-FSHR einen Funktionsverlust hervorrufen würde. Um diese Fragen beantworten zu können, wurde das HA-Epitop in den Wildtyp-FSHR nach der 17. Aminosäure eingefügt und dieser Rezeptor funktionell untersucht. Für den Wildtyp-FSHR mit HA-Epitop (HA-FSHR wt, Tab. 8.1) konnte in ELISA-Experimenten ebenfalls kein und in cAMP-Akkumulationsassays ein geringes Signal gemessen werden. Zudem konnte eine FSH-Behandlung keine hohe ligandenabhängige Rezeptoraktivität im Wildtyp-LHR auslösen. Im Gegensatz dazu war der Wildtyp-FSHR ohne HA-Epitop (FSHR wt, Tab. 8.2) funktional. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass das in die FSHR-Sequenz eingefügte HA-Epitop die Funktionalität vom Wildtyp-FSHR und der FSHR-LHR-Varianten stark beeinträchtigt.

Um trotz des „HA-Epitop-Problems“ den Einfluss der FSHR-EZD auf eine aktive TMD-Konformation des LHR untersuchen zu können, wurde die FSHR-EZD ohne entsprechendes HA-Epitop an die LHR-TMD fusioniert (Abb. 4.4.3A und Tab. 8.1). Neben den FSHR-LHR-Varianten mit aktivierender TMD-Mutation (z. B. FSHR-LHR-L457R) wurde eine FSHR-LHR-Chimäre hergestellt, die keine aktivierende Mutation enthielt (FSHR-LHR). Im Gegensatz zu den mit einem HA-Epitop versehenen FSHR-LHR-Chimären konnten für diese Varianten deutliche rezeptorspezifische cAMP-Akkumulationen nach Expression in COS7-Zellen festgestellt werden. In gleicher Weise, wie die TSHR-LHR-Varianten auf eine Stimulation mit TSH antworteten, induzierten die analogen FSHR-LHR-Chimären nach einer FSH-Behandlung erhöhte ligandenabhängige cAMP-Spiegel in COS7-Zellen (Abb. 4.4.3B und Tab. 8.2). Ein Vergleich der basalen cAMP-Spiegel verriet, dass FSHR-LHR-Varianten, die die L457R- oder D578H-Mutation trugen, nach Expression in COS7-Zellen ähnlich hohe cAMP-Spiegel auslösten wie die LHR-Varianten mit entsprechender Mutation. Obwohl auch FSHR-LHR-Varianten, welche die D564G- oder D578Y-Mutation enthielten, eine deutlich erhöhte cAMP-Akkumulation induzierten, riefen sie in COS7-Zellen jedoch einen geringeren cAMP-Spiegel als



**Abb. 4.4.3. Vergleich der durch N-terminal modifizierte LHR-Varianten hervorgerufenen cAMP-Akkumulation in COS7-Zellen.**

A) Schematische Darstellung der untersuchten LHR-Varianten mit aktivierenden Mutationen. Hellblaue Bereiche und schwarze Linien markieren die LHR-Sequenz. Die in einige LHR-Varianten eingefügte hFSHR-Sequenz ist violett gefärbt, die eingefügte hTSHR-Sequenz grün markiert. Das in die LHR eingefügte HA-Epitop ist in Gelb dargestellt, die in die verkürzten LHR eingeführte V2R-Sequenz rot hervorgehoben. Das rote X markiert die in die Rezeptoren eingefügte aktivierende Mutation. B) Basale und agonistenabhängige cAMP-Akkumulationen sind als Vielfaches vom basalen Wert der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das cAMP-Niveau der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. Zur Bestimmung der agonisteninduzierten cAMP-Akkumulation wurden Zellen, die LHR- oder V2LHR-Varianten exprimierten mit einer 1  $\mu$ molar hCG-Nährlösung inkubiert, wohingegen FSHR-LHR-Chimären exprimierende Zellen mit 100 mU/ml hFSH und TSHR-LHR-Varianten exprimierende Zellen mit 100 mU/ml bTSH behandelt wurden.

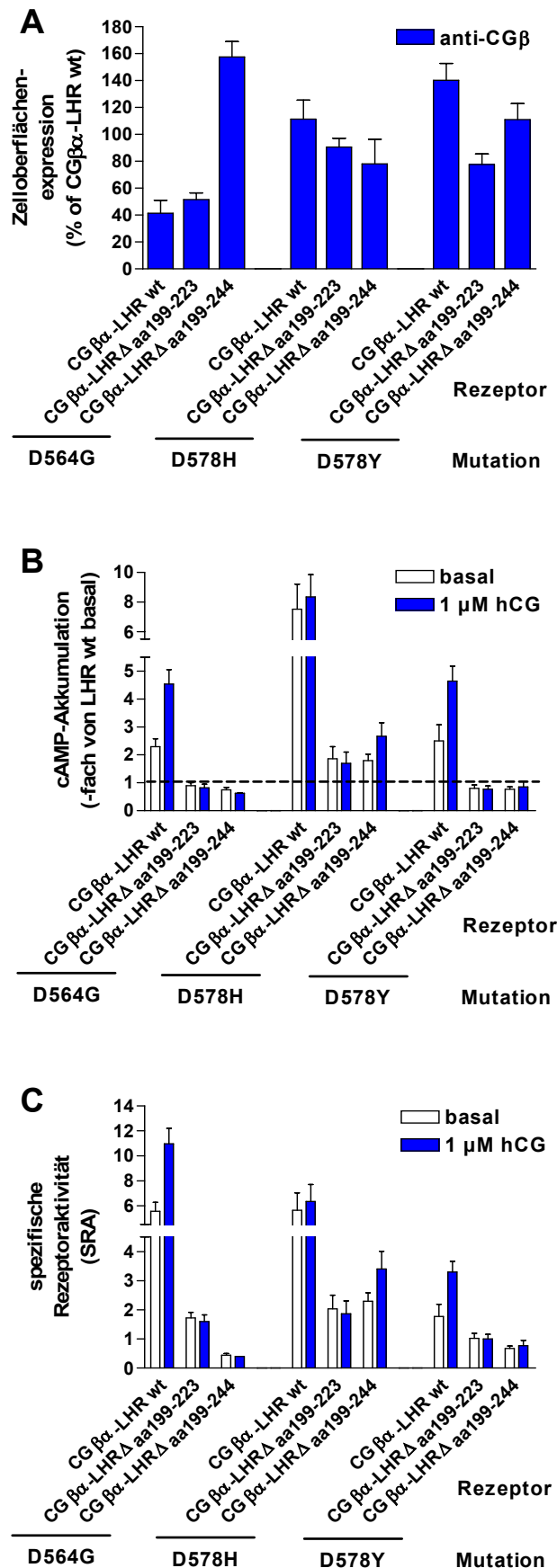
LHR-Varianten mit diesen Mutationen hervor. Insgesamt kann aufgrund der Untersuchungsergebnisse von einer deutlich erhöhten basalen SRA der FSHR-LHR-Varianten ausgegangen werden. Aufgrund eines fehlenden HA-Epitops in den FSHR-LHR-Varianten konnte allerdings keine Zelloberflächenexpressionsrate

dieser Mischrezeptoren in ELISA-Experimenten bestimmt werden. Somit war eine exakte Bestimmung der SRA dieser Rezeptoren, die unsere Vermutung hätten bestätigen können, nicht möglich.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die FSHR-EZD entsprechend der EZD des TSHR nach Bindung des nativen Agonisten eine vermehrte G-Proteinkopplung der TMD des LHR hervorruft. Hinsichtlich der agonistenunabhängigen Rezeptoraktivierung lassen die Untersuchungsergebnisse vermuten, dass die FSHR-EZD die native LHR-EZD nicht komplett funktionell ersetzen kann, dennoch die Effektivität der beschriebenen aktivierenden Mutationen deutlich unterstützt.

#### **4.5 Minderung der Wirkung von aktivierenden LHR-Mutationen bei Deletion von LRR**

Die Untersuchungsergebnisse der vorangegangenen Versuche deuteten darauf hin, dass ausschließlich eine intakte Extrazellulärdomäne einen signifikanten Beitrag zu einer aktiven Rezeptorkonformation leisten bzw. die Aktivität von in der TMD lokalisierten aktivierenden Mutationen unterstützen könnte. Um diesen Eindruck zu bestätigen, wurden zwei der in Kapitel 4.3 beschriebenen, LRR-Deletionen aufweisenden Hormon-Rezeptor-Fusionsproteine ( $\text{CG}\beta\alpha\text{-LHR}\Delta\text{aa199-223}$  und  $\text{CG}\beta\alpha\text{-LHR}\Delta\text{aa199-244}$ ) mit drei der zuvor beschriebenen aktivierenden TMD-Mutationen (D564G, D578H und D578Y) versehen (Tab. 8.1). Die Eigenschaften dieser Hormon-Rezeptor-Fusionsproteine wurden mit denjenigen der  $\text{CG}\beta\alpha\text{-LHR}$  wt-Varianten, welche dieselben aktivierenden Mutationen trugen, verglichen. Das angebundene Hormon in allen Rezeptorvarianten sollte hierbei eine ausreichende Zelloberflächenexpressionsrate gewährleisten, sodass funktionelle Konsequenzen von LRR-Deletionen auf die Aktivität von TMD-Mutationen möglicherweise aufgedeckt werden könnten. Tatsächlich konnte für alle genannten Rezeptorvarianten nach Expression ein deutliches Signal auf der Zelloberfläche von COS7-Zellen festgestellt werden, die auf ein hinreichendes Zellmembran-„Trafficking“ hindeuten (Abb. 4.5.1A und Tab. 8.3). Aufgrund der Verwendung eines Primärantikörpers, der gegen die Hormon- $\beta$ -Untereinheit gerichtet war, war ein Vergleich der Zelloberflächenexpressionsraten dieser Varianten mit derjenigen des



**Abb. 4.5.1. Funktionelle Konsequenz von verschiedenen aktivierenden TMD-Mutationen in Hormon-Rezeptor-Varianten mit bzw. ohne LRR-Deletionen.**

Verschiedene aktivierende TMD-Mutationen wurden in Hormon-Rezeptor-Varianten mit bzw. ohne Deletionen in der LRR-Domäne eingefügt. Die spezifischen Rezeptoraktivitäten (SRA; C) der resultierenden Hormon-Rezeptorfusionsproteine wurden bestimmt, indem die rezeptorabhängige cAMP-Produktion (B) und die Zelloberflächenexpressionsrate jeder Rezeptorvariante (A) in COS7-Zellen ermittelt wurde. A) Die Zelloberflächenexpressionsrate der Hormon-Rezeptor-Varianten wurde in ELISA-Experimenten mittels eines gegen die Hormon-β-Untereinheit gerichteten Antiserums und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers bestimmt. Die gemessenen Signale der Varianten sind als Prozent des Signals von CGβα-LHR wt angegeben. B) Basale und agonistenabhängige cAMP-Akkumulationen sind als Vielfaches des Basal-Wertes der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das cAMP-Niveau der Wildtyp-LHR-transfizierten Zellen. C) Basale und agonistenabhängige spezifische Rezeptoraktivitäten (SRA) jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und rezeptorabhängiger Zelloberflächenexpressionsrate gebildet wurde. Der Messwert der Oberflächenexpression von CGβα-LHR wt wurde dabei gleich 100% gesetzt und die Oberflächenexpressionswerte der übrigen Varianten umgerechnet. Alle angegebenen Zahlenwerte stellen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei in jedem Versuch pro Variante eine Doppel- (cAMP-Akkumulationsassay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgt ist.

Wildtyp-LHR nicht möglich. Jedoch war ein Vergleich der Expressionssignale von Hormon-Rezeptor-Mutanten, die aktivierende Mutationen enthalten, mit derjenigen von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt möglich. Verglichen zur Oberflächenexpressionsrate von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt lag die Expressionsrate der Hormon-Rezeptor-Varianten mit aktivierenden Mutationen zwischen 41% (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D564G) und 158% (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244-D564G) (Abb. 4.5.1A und Tab. 8.3). Nach Bestimmung der cAMP-Spiegel in COS7-Zellen wurde für zwei der drei CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Varianten mit aktivierenden Mutationen eine erhöhte basale SRA ermittelt (Abb. 4.5.1C und Tab. 8.3). Für die dritte Variante, CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D578Y, konnte dagegen nur eine minimal erhöhte basale SRA von 1,8 bestimmt werden. Vergleicht man die basalen SRA von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Mutanten und LRR-Deletionsmutanten mit jeweils der gleichen aktivierenden Mutation, so ist zu erkennen, dass der Effektivität von allen eingeführten aktivierenden Mutationen in der CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Variante am stärksten ist. Es muss noch erwähnt werden, dass zwei der drei CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Varianten (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D564G und CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D78Y) in Anwesenheit von löslichem hCG mit einer weiteren Steigerung der bereits erhöhten SRA reagierten. In abgeschwächter Form ließ sich dieses Phänomen für die Mutanten CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D78H und CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244-D578H beobachten. All diese Rezeptoren scheinen trotz kovalent gebundenem hCG zusätzlich lösliches hCG binden und die G-Proteinkopplungsrate noch steigern zu können.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass Deletionen in der LRR-Domäne die Aktivität von in der TMD lokalisierten, aktivierenden Mutationen dramatisch reduzieren. Die Deletion von LRR scheint daher eine „missgefaltete“ oder „entartete“ EZD hervorzurufen. Dadurch wird eine inaktive Konformation der Transmembrandomäne begünstigt, in welcher aktivierende TMD-Mutationen nicht mehr oder nur begrenzt in der Lage sind, ihre Wirkung zu entfalten.

## 5 Diskussion

Ein besseres Verständnis des Mechanismus, nach dem Glykoprotein-hormon-Rezeptoren durch Bindung des Hormons oder durch Präsenz von aktivierenden Mutationen in eine aktive Rezeptorkonformation überführt werden, ist für die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung diverser Krankheiten, die im Zusammenhang mit einer Fehlfunktion der Glykoprotein-hormone bzw. ihrer Rezeptoren stehen, zwingend notwendig. Seit der Klonierung des LHR im Jahre 1989 sind viele Versuche unternommen worden, den exakten Mechanismus der Rezeptoraktivierung zu entschlüsseln. Leider konnten bis jetzt nur einzelne Mosaiksteine in dem komplexen Mechanismus aufgedeckt werden. Zudem wurden und werden viele Beobachtungen kontrovers diskutiert. Die Untersuchungen zu dieser Arbeit, für die genetisch veränderte LHR herangezogen wurden, zeigen, dass die EZD des LHR neben der Funktion der Hormonbindung auch einen wichtigen Einfluss auf eine aktive Konformation der Transmembrandomäne ausübt. Hierbei scheint die EZD bestimmte Zustände der TMD zu stabilisieren, die ein leichteres Einwirken des Hormons sowie von aktivierenden, in der TMD lokalisierten Mutationen ermöglichen. Auch zeigen die erhobenen Daten, dass die EZD des LHR intakt sein muss, damit sie einen Beitrag zu einer aktiven Konformation der Transmembrandomäne leisten kann. Die EZD der zum LHR verwandten Glykoprotein-hormon-Rezeptoren TSHR oder FSHR sind nicht in der Lage, eine Konformation der LHR-TMD zu induzieren, bei der in der TMD lokalisierte aktivierende Punktmutationen ihre Wirkung entfalten bzw. vollständig entfalten können.

### 5.1 Die Extrazellulärdomäne stellt keinen intramolekularen inversen Agonisten dar

Aufgrund von Untersuchungen am TSHR wurde die Theorie aufgestellt, dass die EZD der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren als intramolekularer inverser Agonist die Transmembrandomäne in einem inaktiven Zustand halten würde, wobei der inhibitorische Effekt der EZD erst durch Hormonbindung oder die Wirkung von aktivierenden Mutationen aufgehoben werde (Zhang et al., 1995; Van Sande et al., 1996; Grütters et al., 1998; Nakabayashi et al., 2000; Zhang et al., 2000; Nishi et al., 2002; Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Diese Annahme wird durch die Beobachtung



gestützt, dass TSHR-Varianten, denen die komplette EZD oder bestimmte Bereiche der EZD fehlen, eine im Vergleich zum Wildtyp-TSHR stark erhöhte basale Rezeptoraktivität aufweisen (Zhang et al., 1995; Zhang et al., 2000; Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Ein weiteres Indiz dafür, dass die TSHR-EZD eine hemmende Wirkung auf die Rezeptoraktivität hat, ist die Tatsache, dass TSHR-exprimierende Zellen auf eine schonende Behandlung mit Trypsin mit einem deutlich erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel reagieren (Van Sande et al., 1996). Es wird angenommen, dass durch die Trypsin-Behandlung ein Bereich der EZD entfernt oder zerstört wird, der einen inhibitorischen Einfluss auf die TMD ausübt. Um zu überprüfen, ob in der EZD des LHR Strukturen lokalisiert sind, die als inverser Agonist die TMD in einem inaktiven Zustand halten, wurde die EZD schrittweise N-terminal verkürzt und die daraus resultierenden LHR-Varianten funktionell untersucht. Da beschrieben worden ist, dass verkürzte LHR nur unzureichend an die Zelloberfläche transferiert werden (Sanguhl et al., 2002), wurden alle verkürzten Varianten N-terminal mit einer 39 Aminosäuren langen Sequenz des humanen Vasopressin-2-Rezeptors (hV<sub>2</sub>R) versehen, die eine ausreichende Zelloberflächenexpression der Rezeptoren gewährleisten sollte. In der Tat konnten die N-terminal verkürzten LHR im Vergleich zum Wildtyp-LHR in ähnlicher Anzahl in der Plasmamembran von COS-7-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.1.3B). Zur Ermittlung der Signaltransduktionseigenschaften der verkürzten LHR wurde ihre spezifische basale Rezeptoraktivität (basale SRA) mit der des Wildtyp-LHR verglichen. Hierfür wurden COS-7-Zellen, welche die jeweilige LHR-Variante exprimierten, auf den rezeptorinduzierten intrazellulären cAMP-Gehalt untersucht und dieser Wert in Relation zur Zelloberflächenexpression des Rezeptors gesetzt. Diese funktionelle Analyse ergab, dass die verkürzten LHR im Vergleich zum Wildtyp-LHR keine erhöhte SRA aufwiesen. Vielmehr zeigten die Analysen, dass sie sogar zu einer niedrigeren basalen Aktivität als der Wildtyp-LHR tendierten (Abb. 4.1.3D). Unsere Untersuchungen an der V2LHR-Mutante konnten die Beobachtungen von Sanguhl et al. bestätigen, dass diese Mutante keine erhöhte Rezeptoraktivität aufweist (Sanguhl et al., 2002). Darüber hinaus zeigten unsere Daten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sanguhl et al., dass die niedrige rezeptorabhängige cAMP-Akkumulation der V2LHR-exprimierenden Zellen nicht auf eine im Vergleich zum Wildtyp-LHR verringerte Zelloberflächenexpression zurückzuführen ist (Abb. 4.1.3B).

Mögliche Ursachen für die stark erniedrigte Rezeptoraktivität der verkürzten LHR konnten folgende sein:

- 1) Die am N-terminalen Ende in die verkürzten LHR eingefügte Sequenz des hV<sub>2</sub>R, die sich deutlich von der EZD des LHR unterscheidet, resultiert in einer Fehlfaltung der LHR-TMD, die keine hinreichende Kopplung an G-Proteine zulässt.
- 2) Im Gegensatz zur TSHR-EZD stellt die EZD des LHR keinen angebundenen inversen Agonisten dar, der die TMD in einem inaktiven Zustand hält, sondern ist gerade ein wichtiger Bestandteil, eine aktive Konformation zu stabilisieren.

Der erste Punkt kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Austausch der hV<sub>2</sub>R-Sequenz gegen eine äquivalente des humanen M<sub>3</sub>-Muskarin-Rezeptors zu den gleichen Ergebnissen führt, und zwar zu einer im Vergleich zum Wildtyp-LHR drastischen Reduktion der Signaltransduktions-eigenschaften (Sangkuhl et al., 2002). Auch kann in unseren funktionellen Analysen eindeutig gezeigt werden, dass die V2LHR-Variante prinzipiell zu einer vermehrten G-Proteinkopplung fähig ist. Die natürlich vorkommende Mutation D578H, die im Wildtyp-LHR eine stark erhöhte Rezeptoraktivität hervorruft, führt in der V2LHR-Mutante ebenfalls zu einer drastischen Erhöhung der basalen Rezeptoraktivität (Abb. 4.4.2D). Darüber hinaus konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass LHR, denen die EZD fehlt und die keine zusätzlichen expressionserleichternden Strukturen enthalten, keine erhöhte basale oder agonisteninduzierte Aktivität zeigen (Osuga et al., 1997; Sangkuhl et al., 2002). Diese Fakten deuten schlussendlich auf Punkt 2. Entgegen der Beobachtungen zur EZD des TSHR und FSHR kann die LHR-EZD kein angebundener inverser Agonist sein, der die TMD in einem inaktiven Zustand hält. Ein weiteres Indiz dafür, dass die EZD der unterschiedlichen Glykoprotein-hormon-Rezeptoren unter Umständen receptorspezifische Funktionen ausüben, ist die Tatsache, dass der TSHR insbesondere im Vergleich zum LHR eine hohe basale Rezeptoraktivität aufweist. Dieser Unterschied lässt für den TSHR eine andere Interaktion zwischen EZD und TMD als für den LHR vermuten. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, dass von Karges et al. für den LHR eine Interaktion der EZD mit der TMD beschrieben worden ist, die im inaktiven wie auch im aktiven Zustand des Rezeptors vorhanden ist (Karges et al., 2005). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass nach Entfernen des N-terminalen Bereiches der EZD mittels einer eingefügten Enzymschnittstelle keine erhöhte cAMP-Akkumulation in LHR-exprimierenden Zellen festzustellen gewesen ist. Darüber hinaus bestätigen unsere Daten die Beobachtungen, dass die Hormonbindung weitestgehend von der LRR-Domäne erfolgt. Die verkürzten LH-Rezeptoren, denen die

LRR-Domäne fehlt, können das Hormon nicht binden und rufen daher in einem heterologen Expressionssystem keine agonisteninduzierte cAMP-Produktion hervor (Abb. 4.1.3E und Tab. 8.2).

Alles in allem belegen unsere Versuchsergebnisse sowie die Daten früherer Studien (Sangkuhl et al., 2002; Karges et al., 2005), dass die EZD des LHR die TMD nicht über Interaktionspunkte in einem inaktiven Zustand hält. Ein negativer Einfluss der EZD des LHR auf eine aktive Rezeptorkonformation kann daher ausgeschlossen werden. Die erhobenen Daten deuten eher darauf hin, dass die EZD des LHR einen leicht positiven Effekt auf eine aktive TMD-Konformation ausübt.

## **5.2 Eine intakte Extrazellulärdomäne ist für eine agonisteninduzierte Rezeptoraktivität notwendig**

Der positive Einfluss der Extrazellulärdomäne auf die ligandenunabhängige Rezeptoraktivität, der sich in den ersten Experimenten angedeutet hat, warf die Frage auf, ob sie ebenfalls eine aktive Konformation im Rahmen einer agonisteninduzierten Rezeptoraktivierung unterstützen würde. Da den N-terminal verkürzten LHR in unserer Studie die hormonbindende LRR-Domäne fehlte, war es verständlich, dass sie auf eine Hormon-Stimulation nicht reagierten (Abb. 4.1.3E und Tab. 8.2). Um trotzdem die Bedeutung der EZD für eine agonistenabhängige Rezeptoraktivität außerhalb einer Hormonbindefunktion untersuchen zu können, wurde das Hormon hCG kovalent an das N-terminale Ende der verkürzten LHR (CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR) und den Wildtyp-LHR (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) fusioniert. Diese Hormon-Rezeptor-Fusionproteine erlaubten es uns, den Einfluss der EZD auf die Rezeptoraktivität in Anwesenheit des Hormons – in diesem Fall des angebundenen hCG – zu untersuchen.

Entsprechend früherer Studien (Narayan et al., 2000; Schubert et al., 2003) resultierte die Fusion des hCG mit dem Wildtyp-LHR (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) in einem Rezeptor, der konstitutiv aktiv war (Abb. 4.2.4D). Narayan et al. konnten für ihre Hormon-Rezeptor-Variante allerdings höhere basale Aktivitäten bzw. rezeptor-induzierte cAMP-Spiegel ermitteln, als wir dies für unsere Variante feststellen konnten. Diese Diskrepanz kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass sich die Hormon-Rezeptor-Variante von Narayan et al. hinsichtlich der zwischen Hormon und Wildtyp-LHR eingefügten Linkersequenz von unserer Variante unterschied. In unserer Hormon-Rezeptor-Variante (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) war dieser Linker kürzer als im Konstrukt von Narayan und Kollegen. Als Linker fungierte in unserer Hormon-Rezeptor-Variante

ein HA-Epitop (Abb. 4.2.1A). Unter Umständen war durch den kurzen Linker die Bewegungsfreiheit des angebundenen Hormons etwas eingeschränkt, sodass keine vollständige Hormon-Rezeptor-Interaktion erfolgen und keine maximale G-Proteinkopplung ausgelöst werden konnte. Dennoch zeigten die Ergebnisse zur CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-Variante, dass das einkettige hCG, dass an den LHR fusioniert wurde, wie in einer früheren Studie beschrieben (Sugahara et al., 1995), aktiv war. Erstaunlicherweise resultierte die Anwesenheit von löslichem hCG in einer weiteren Steigerung der bereits erhöhten Rezeptoraktivität von CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt. Diese Beobachtung ist deshalb erwähnenswert, da hCG als Glykoproteinhormon ein relativ großes Protein darstellt und wir annahmen, dass das angebundene hCG aufgrund sterischer Hinderung eine Bindung von zusätzlichem, löslichem hCG durch den Rezeptor nicht zuließe. In Gegensatz zum Wildtyp-LHR mit angebundenem hCG war bei keiner der verkürzten LHR mit angebundenem Hormon (CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR und CG $\beta$  $\alpha$ -V2hingeLHR) eine erhöhte basale oder agonisteninduzierte Aktivität festzustellen (Abb. 4.2.4D und Tab. 8.3). Mögliche Ursachen für diesen Befund konnten folgende sein:

- 1) Bestimmte Strukturen in der EZD sind notwendig, um eine Konformationsänderung des Hormons nach dessen Bindung an den Rezeptor zu induzieren. Eine solche Konformationsänderung könnte möglicherweise entscheidend für eine ligandeninduzierte Rezeptoraktivierung sein. Es konnte von Fan et al. gezeigt werden, dass eine solche Konformationsänderung nach Bindung von hFSH an die Hormonbindedomäne des FSHR erfolgt (Fan & Hendrickson, 2005 (b)). Diese rezeptorinduzierte Konformationsänderung des Hormons (z. B. in den Hormon-Schleifen oder im C-Terminus der Hormon- $\alpha$ -Untereinheit) könnte möglicherweise nicht in den verkürzten Hormon-Rezeptor-Varianten erfolgen, da ihnen bestimmte Bereiche in der EZD (z. B. die LRR-Domäne) fehlten. Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch erwähnt werden, dass einkettige Glykoproteinhormon-Analoga über eine bemerkenswerte Flexibilität verfügen. In verschiedenen Studien (Garcia-Campayo et al., 2002; Ben-Menahem, 2004; Garcia-Campayo et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass Hormon-Varianten, die CG-, FSH- und TSH- $\beta$ -Untereinheiten enthalten, in vitro und in vivo CG-, FSH- und TSH-Aktivität besitzen können.
- 2) Für eine aktive Konformation der TMD ist die Präsenz von bestimmten Bereichen des Hormons und der EZD oder der EZD alleine notwendig. Bei

den verkürzten Rezeptor-Varianten mit angebundenem hCG ist zwar das Hormon vorhanden, aber aufgrund der N-terminalen Verkürzung fehlen möglicherweise die Aktivierungsdeterminanten in der EZD.

- 3) Das Hormon, im Zusammenspiel mit der EZD, bzw. das Hormon alleine sind die entscheidenden Faktoren zur Induktion eines aktiven Zustandes der TMD. Allerdings ist es möglich, dass bei den verkürzten LHR mit angebundenem hCG die kurze Linkersequenz zwischen Hormon und Rezeptor die Bewegungsfreiheit des hCG einschränkt, sodass es nicht in adäquater Weise mit der TMD interagieren und eine vermehrte G-Proteinkopplung auslösen kann.

Um den dritten Punkt ausschließen zu können oder zumindest näher zu beleuchten, haben wir zur Verlängerung des Linkers zwischen Hormon und N-terminal kürzestem LHR (V2LHR) eine zusätzliche Sequenz eingefügt. Diese Linkersequenz sollte im Idealfall keinen positiven oder negativen Einfluss auf das Hormon oder den Rezeptor nehmen. Wenn tatsächlich eine agonistische Struktur in der EZD vom LHR oder anderen Rezeptoren der selben Familie zu finden wäre, so sollte nach unseren Überlegungen die Linkersequenz nur eine geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zur LHR-EZD aufweisen, um nicht deren Struktur nachzuahmen und somit möglicherweise selbst als intramolekularer Agonist auf die TMD zu wirken. In einem solchen Fall könnten nur schwerlich Rückschlüsse hinsichtlich der Funktion der EZD und des Hormons getroffen werden. Der Linker sollte darüber hinaus möglichst nicht die Anordnung des angebundenen hCG zur Transmembrandomäne beeinflussen, indem er eine entartete Konformation von Hormon und/oder Rezeptor fördere. In diesem Zusammenhang suchten wir nach einer Sequenz als Linker, die eine ausreichende Bewegungsfreiheit des Hormons gewährleisten und im Idealfall eine ähnliche Länge wie die EZD des LHR aufweisen sollte. Wir vermuteten, dass die EZD des hLGR7, eines Rezeptors, der wie die Glykoproteinhormon-Rezeptoren zur Subfamilie der LGR gehört (Hsu et al., 2000; Hsu et al., 2002; Herpin et al., 2004), diese Kriterien erfüllen würde. Denn es wird angenommen, dass die EZD des hLGR7 eine im Vergleich zur EZD der Glykoproteinhormon-Rezeptoren ähnliche Faltstruktur besitzt, obgleich sich ihre Aminosäuresequenz deutlich von derjenigen der Glykoproteinhormon-Rezeptoren unterscheidet (Hsu et al., 2000). Der größte Teil der EZD des hLGR7 (Aminosäuren 108-414) wurde in die Variante CG $\beta$  $\alpha$ -V2LHR zwischen hCG und N-Terminus des Rezeptors eingefügt, sodass die Mutante CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR entstand. Die funktionelle Analyse ergab, dass diese Variante

ebenfalls keine signifikant erhöhte basale oder agonisteninduzierte SRA aufwies (Abb. 4.2.4D und Tab. 8.3). Zwar mag die im Vergleich zum Wildtyp-LHR mit Hormon um 32% erniedrigte Zelloberflächenexpressionsrate in exprimierenden Zellen zu einem leicht reduzierten cAMP-Spiegel und damit einer geringeren SRA beitragen (Abb. 4.2.4B und Tab. 8.3), dass eine Oberflächenexpressionsrate in diesem Rahmen allerdings eine derartig niedrige SRA hervorruft, darf bezweifelt werden. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass eine fehlende native EZD der Grund für die erniedrigte Rezeptoraktivität der CG $\beta$  $\alpha$ -V2LGR7LHR-Variante ist. Trotz der sorgfältigen Auswahl des Linkers kann nicht ausgeschlossen werden, dass der als Linker genutzte Teil des hLGR7 nicht doch eine entartete Konformation von Hormon und/oder Rezeptor fördert.

Insgesamt lassen die Versuchsergebnisse den Schluss zu, dass zur Induktion einer aktiven LHR-Konformation in einem agonistenabhängigen Aktivierungsprozess eine intakte native EZD notwendig ist und dass das Hormon alleine nicht für eine Rezeptoraktivierung ausreicht.

### **5.3 Die LRR der Extrazellulärdomäne unterstützen eine aktive Rezeptorkonformation**

Ein herausragendes strukturelles Merkmal der EZD des LHR und der übrigen Glykoproteinhormon-Rezeptoren stellt die LRR-Domäne dar. Fan et al. konnten zeigen, dass die EZD des humanen FSH-Rezeptor (hFSHR) aus elf, unregelmäßig geformten LRR besteht, wobei der C-terminale Teil der *Cysteinbox-1* den ersten LRR darstellt (Fan & Hendrickson, 2005 (b)). Aufgrund der nahen Verwandtschaft des hFSHR zu den übrigen Glykoproteinhormon-Rezeptoren wird für den hLHR eine ähnliche Struktur angenommen (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die N-terminalen LRR der Glykoproteinhormon-Rezeptoren an der Bindung des Hormons beteiligt sind (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird die Rolle der C-terminalen LRR bei der Hormonbindung kontrovers diskutiert (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998; Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Falls die C-terminalen LRR nicht am Prozess der Hormonbindung beteiligt sind, so unsere Überlegung, könnten sie möglicherweise einem anderen Zweck innerhalb des Aktivierungsprozesses dienen. Vielleicht sind sie oder bestimmte Strukturen in ihnen an der Stabilisierung einer aktiven TMD-Konformation nach Hormonbindung beteiligt oder wirken gar selbst als intramolekularer Agonist auf die

TMD. In früheren Studien sind Versuche unternommen worden, mögliche agonistische Strukturen in der LRR-Domäne des LHR zu identifizieren, indem Bereiche dieser Domäne entfernt worden sind. Allerdings zeigten die Studien, dass LHR, denen Bereiche der LRR-Domäne fehlen, nur unzureichend an die Zelloberfläche transferiert werden und demnach nicht funktionell untersucht werden können (Thomas et al., 1996; Sangkuhl et al., 2002). Da wir die Thematik aufgreifen wollten, überlegten wir, wie ein ausreichendes Zelloberflächen-„Targeting“ von LRR-Deletionsmutanten gewährleistet werden könnte, um sie funktionell untersuchen zu können. Da der im vorigen Kapitel vorgestellte Wildtyp-LHR mit angebundenem hCG (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt) eine ausreichende Zelloberflächenexpressionsrate aufwies, entfernten wir einzelne oder mehrere C-terminale LRR aus dieser Hormon-Rezeptor-Variante. Die resultierenden LRR-Deletionsmutanten sollten, so unsere Überlegung, in ähnlicher Anzahl wie die Wildtyp-Variante CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt auf der Zelloberfläche zu identifizieren sein und somit erstmals einen Vergleich der Aktivitäten von LRR-Deletionsmutanten mit einer Wildtyp-Variante zulassen. Es könnte, so unsere Hoffnung, möglicherweise anhand dieser LRR-Deletionsmutanten geklärt werden, welchen Effekt die C-terminalen LRR auf eine agonisteninduzierte Rezeptoraktivierung ausüben. Um die funktionellen Unterschiede zwischen N- und C-terminalen LRR zu verdeutlichen, wurde neben den C-terminalen LRR-Deletionsmutanten noch eine weitere LRR-Deletionsmutante (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124) hergestellt, welcher die Aminosäuren 100 bis 124 fehlte. Diese Sequenz liegt inmitten der N-terminalen LRR, die in mehreren Studien als Hormonbindeeinheit identifiziert werden konnten (Braun et al., 1991; Bhowmick et al., 1996; Thomas et al., 1996; Hong et al., 1998; Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Wir vermuteten, dass CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124 im Gegensatz zu den C-terminalen LRR-Deletionsmutanten kein lösliches hCG binden und daher in Anwesenheit von solchem nicht mit einer vermehrten G-Proteinkopplung reagieren könnte. Eine Analyse der Zelloberflächenexpressionsrate der LRR-Deletionsmutanten ergab, dass sie zwar nicht in dem Ausmaß wie CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt auf der Zelloberfläche nachweisbar waren, sie aber dennoch effizient an die Zelloberfläche transferiert wurden (Abb. 4.3.3A und Tab. 8.3). Durch das Vorhandensein des Hormons konnte demnach tatsächlich ein ausreichendes Zelloberflächen-„Trafficking“ der LRR-Deletionsmutanten gewährleistet werden. Das an den Deletionsmutanten gebundene Hormon schien demnach das Plasmamembran-„Targeting“ dieser Varianten zu erleichtern. Entsprechend unserer Prognose reagierte die Hormon-Rezeptor-Variante, der ein Teil der N-terminalen LRR-Domäne fehlte (CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124), in Anwesenheit von löslichem hCG nicht mit

einer Steigerung der basalen Rezeptoraktivität (Abb. 4.3.3C und Tab. 8.3). Ähnliches ließ sich allerdings auch für die C-terminalen LRR-Deletionsmutanten feststellen. Keine der C-terminalen LRR-Deletionsmutanten antwortete auf lösliches hCG mit einer Steigerung der basalen Rezeptoraktivität. Darüber hinaus resultierte weder das Entfernen der N-terminalen noch die Deletion der C-terminalen LRR in einer gesteigerten basalen Rezeptoraktivität. In beiden Fällen führte die Deletion von LRR sogar zu einem Verlust der durch das Hormon hervorgerufenen hohen Rezeptoraktivität. Ferner blieb die Suche nach einem intramolekularen Agonisten erfolglos. Das Entfernen jeglicher Teilbereiche der C-terminalen LRR resultierte in LHR mit verminderter Rezeptoraktivität.

Für diese Beobachtungen gibt es folgende Erklärungen:

- 1) Das Hormon wird von den C-terminalen wie auch den N-terminalen LRR gebunden und alle natürlichen Interaktionspunkte zwischen Hormon und EZD müssen vorhanden sein, damit eine agonisteninduzierte Rezeptoraktivierung erfolgen kann. Diese Hypothese wäre im Einklang mit dem Modell von Fan et al., wonach in allen LRR des FSH-Rezeptors Strukturen zu finden sind, die mit dem Hormon interagieren (Fan & Hendrickson, 2005 (b)).
- 2) Eine in der EZD vorhandene agonistische Struktur liegt nicht als einzelnes Epitop vor, sondern ist ein Konglomerat aus mehreren Bereichen der EZD, die nach Hormonbindung mit der TMD interagieren. Das Entfernen von einzelnen LRR könnte daher eine Konformation der EZD hervorrufen, in der keine multiplen EZD-TMD-Kontaktpunkte ausgebildet werden können, welche für eine agonisteninduzierte Rezeptoraktivierung notwendig sind.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass in unseren Untersuchungen kein linearer Bereich in der LRR-Domäne identifiziert werden kann, der eine agonistische Eigenschaft besitzt bzw. einen herausragenden positiven Einfluss auf eine aktive, hormoninduzierte TMD-Konformation ausübt. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass die LRR-Domäne oder möglicherweise die gesamte EZD intakt sein muss, damit sie einen aktiven, agonisteninduzierten Rezeptorzustand stabilisieren kann.



#### **5.4 Die intakte native Extrazellulärdomäne ist für eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung notwendig**

Eine Aktivierung der Glykoproteinhormon-Rezeptoren oder auch anderer Vertreter der GPCR ist nicht zwangsläufig von der Bindung des jeweiligen Agonisten an diese Rezeptoren abhängig. Mutationen, die mit einem Austausch einer bestimmten Aminosäure gegen eine andere verbunden sind, können ebenfalls dazu führen, dass diese Rezeptoren partiell oder sogar vollständig in einen aktiven Rezeptorzustand überführt werden. Die Daten aus Mutagenesestudien und Molecular-Modeling-Versuchen deuten darauf hin, dass Mutationen, die eine konstitutive Aktivität des LHR auslösen, in der Nähe von polaren und innerhalb der Rhodopsin-Rezeptorfamilie konservierten Aminosäuren lokalisiert sind (Ascoli et al., 2002). In diesen Positionen induzieren solche Mutationen eine aktive Rezeptorkonformation, indem sie bestimmte, im inaktiven Zustand vorhandene Kontaktpunkte zwischen verschiedenen Transmembranhelices verhindern und/oder zur Ausbildung neuer interhelikaler Bindungen führen (Kosugi et al., 1996; Angelova et al., 2002; Ascoli et al., 2002; Zhang et al., 2005). Beispielsweise konnte für die Mutation L457R gezeigt werden, dass sie eine hohe hormonunabhängige Aktivität des hLHR hervorruft, indem sie die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arginin-457 in TMD-3 und Aspartat-578 in TMD-6 bewirkt (Zhang et al., 2005). Bei diesem Prozess soll gleichzeitig die Bindung zwischen den zytosolischen Enden dieser Helices, insbesondere die Interaktion zwischen Arginin-464 und Aspartat-564 gelockert werden (Zhang et al., 2005). In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass ein Aminosäureaustausch an der Position 556 des Ratten-LHR eine hohe basale Rezeptoraktivität auslösen kann, indem die im Wildtyp-LHR vorhandene Wasserstoffbrückenbindung zwischen Aspartat-556 und Asparagin-593 zerstört bzw. beeinträchtigt wird (Angelova et al., 2002). Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass stark aktivierende TMD-Mutationen im Allgemeinen zu einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arginin-442 und Aspartat-542 des Ratten-LHR führen. Des Weiteren wird vermutet, dass die Aspartat-Seitenkette an Position 578 des hLHR eine inaktive Rezeptorkonformation stabilisiert, indem sie als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert (Kosugi et al., 1996). Laut mehrerer Computersimulationen, die auf der Kristallstruktur des Rhodopsins (Palczewski et al., 2000) basieren, stabilisieren aktivierende Mutationen über Ausbildung interhelikaler Bindungen und Unterbindung anderer interhelikaler Kontaktpunkte nicht nur einen aktiven LHR-Zustand, sondern verbessern auch die „Solvent Accessibility“ zu den zytosolischen Enden der TMD-3 und -6

(Angelova et al., 2002; Ascoli et al., 2002; Fanelli et al., 2004; Zhang et al., 2005). Diese Eigenschaft ist möglicherweise ein zusätzlicher Grund für die vermehrte G-Proteinkopplung von LHR mit aktivierenden Mutationen.

Wir haben vier solcher stark aktivierender und in der TMD lokalisierter Mutationen (L457R in TMD-3, D564G in IL-3, D578H und D578Y in TMD-6) genutzt, um weitere Erkenntnisse hinsichtlich des Mechanismus der LHR-Aktivierung zu gewinnen. Da die basale Rezeptoraktivität des LHR im Vergleich z. B. zum TSHR sehr niedrig ist (Cetani et al., 1996) und kleine Unterschiede in der Rezeptoraktivität von modifizierten LHR daher mitunter schwer nachzuweisen sind, haben wir versucht, anhand dieser aktivierenden Mutationen die basale LHR-Aktivität zu erhöhen und etwaige Aktivitätsunterschiede besser bestimmen zu können.

Alle in dieser Arbeit verwendeten TMD-Mutationen sind in Patienten identifiziert worden und bewirken eine starke ligandenunabhängige Rezeptoraktivität (Laue et al., 1995 (a); Latronico et al., 1998 (a); Muller et al., 1998; Kremer et al., 1999; Liu et al., 1999; Zhang et al., 2005). Die beschriebenen aktivierenden Mutationen wurden in die N-terminal kürzeste LHR-Variante (V2LHR) und den Wildtyp-LHR eingefügt. Die resultierenden Rezeptoren wurden heterolog exprimiert und auf ihre Signaltransduktionseigenschaften untersucht. Wir hofften, hierüber die Frage klären zu können, ob die TMD des LHR durch aktivierende Mutationen auch ohne die Präsenz der EZD aktiviert werden kann. Der Vergleich von Wildtyp-LHR- und V2LHR-Varianten mit jeweils der gleichen Mutation ergab, dass die Aktivität von drei der vier TMD-Mutationen in Abwesenheit der EZD deutlich reduziert gewesen ist (Abb. 4.4.2D und Tab. 8.2). Der Austausch der Aminosäure Aspartat gegen Histidin an der Position 578 des hLHR (D578H) stellte hierbei eine Ausnahme dar. Im Wildtyp-LHR sowie der V2LHR-Variante induzierte dieser Aminosäureaustausch gleichermaßen eine hohe basale Rezeptoraktivität. Die D578H-Mutation konnte 1999 in Patienten mit Leydig-Zell-Adenoma nachgewiesen werden und löst eine starke hormonunabhängige Rezeptoraktivität im LH-Rezeptor aus (Liu et al., 1999). Ähnlich zu der Beobachtung, dass nur eine aktivierende Mutation der TMD-6 einen N-terminal verkürzten LHR in eine aktive Konformation zwingen kann, waren in einem N-terminal verkürzten TSHR ebenfalls ausschließlich TMD-6-Mutationen fähig, eine hohe hormonunabhängige Rezeptoraktivität hervorzurufen (Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Mutationen, die in den Extrazellulärschleifen lokalisiert waren, konnten den verkürzten TSHR hingegen nicht in einen aktiven Rezeptorzustand zwingen. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen zum verkürzten LHR waren allerdings in der Studie zum verkürzten

TSHR mehr als eine TMD-6-Mutation aktiv. Daher nimmt man an, dass der TSHR im Gegensatz zum LHR für aktivierende Mutationen empfänglicher ist (Cetani et al., 1996; Biebermann et al., 1998; Schulz et al., 1999).

Der Vergleich von Wildtyp-LHR und N-terminal verkürzter Variante mit jeweils der gleichen aktivierenden Mutation zeigt, dass das Entfernen der kompletten EZD im LHR die Effektivität der meisten aktivierenden TMD-Mutationen erheblich erniedrigt oder deren Effekt sogar auslöscht. Eine intakte LHR-EZD scheint demnach eine Konformation der Transmembranhelices zu fördern, in der aktivierende Mutationen ihre volle Wirkung entfalten können. Hierbei muss die EZD eine Konformation ermöglichen, in der aktivierende Mutationen die Ausbildung bzw. den Bruch von bestimmten interhelikalen Kontaktpunkten herbeiführen. Das Resultat ist ein aktiver TMD-Zustand mit vermehrter G-Proteinkopplung. In Abwesenheit einer LHR-EZD scheinen die Transmembranhelices dagegen in einer anderen Anordnung vorzuliegen. Aktivierende Mutationen können in dieser Anordnung nur unzureichend oder erschwert bestimmte interhelikale Kontaktpunkte ausbilden bzw. unterbinden, sodass ein aktiver Rezeptorzustand nicht induziert werden kann.

Die bis zum damaligen Zeitpunkt erhobenen Daten warfen die Frage auf, ob ausschließlich die intakte LHR-EZD eine Konformation der Transmembranhelices fördern würde, in der aktivierende TMD-Mutationen ihre volle Wirkung entfalten können, oder ob die EZD anderer Glykoprotein-hormon-Rezeptoren einen ähnlichen Effekt auf die TMD des LHR ausüben würden. Insbesondere stellte sich die Frage, ob die EZD des TSHR entsprechend der LHR-EZD eine für aktivierende Mutationen förderliche Konformation stabilisieren oder als inverser Agonist gerade das Gegenteil bewirken würde. Zur Klärung dieser Fragen stellten wir LHR her, bei denen die arteigene EZD gegen diejenige des TSHR bzw. FSHR ausgetauscht worden waren. Entsprechend der LHR-EZD war auch in die EZD des TSHR und FSHR aminoterminal ein HA-Epitop zum immunologischen Nachweis der Rezeptoren eingefügt worden.

Alle TSHR-LHR-Varianten konnten nach heterologer Expression auf der Oberfläche von COS7-Zellen nachgewiesen werden und reagierten darüber hinaus auf eine TSH-Stimulation mit einer erhöhten Rezeptoraktivität (Abb. 4.4.2B-D und Tab. 8.2). Während sich für die mit einem HA-Epitop versehenen FSHR-LHR-Varianten keine Expressionssignale auf der Zelloberfläche und keine rezeptorinduzierten cAMP-Spiegel feststellen ließen, lösten FSHR-LHR-Varianten ohne HA-Epitop in COS7-Zellen eine vermehrte cAMP-Produktion nach FSH-Stimulation aus (Abb. 4.4.3B und Tab. 8.2). Da in unseren Versuchen ein mit einem HA-Epitop versehener

Wildtyp-FSHR im Gegensatz zu seinem Pendant ohne HA-Markierung ebenfalls nicht funktional gewesen ist (Tab. 8.2), muss davon ausgegangen werden, dass das in die FSHR-EZD eingefügte HA-Epitop Rezeptoren hervorruft, die nicht über ein ausreichendes Zelloberflächen-„Targeting“ verfügen und daher keine rezeptorinduzierte cAMP-Produktion in COS7-Zellen auslösen können. Die Möglichkeit, dass das HA-Epitop fälschlicherweise inmitten einer bestimmten Rezeptordomäne eingefügt worden ist und damit die natürliche EZD- bzw. Rezeptorkonformation stört, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Allerdings wurde die Position, an der das HA-Epitop in die FSHR-EZD eingeführt worden ist, aufgrund von eigenen Sequenzanalysen sowie publizierter Daten (Kumar & Trant 2001) gewählt. Laut dieser Daten sollte das HA-Epitop zwischen dem Signalpeptid und der *Cysteinbox-1* eingefügt worden sein und die Funktion der EZD bzw. des gesamten Rezeptors gar nicht oder nur geringfügig beeinflussen. Dass das HA-Epitop versehentlich innerhalb des Signalpeptids oder innerhalb der *Cysteinbox-1* eingefügt worden ist, darf als unwahrscheinlich angesehen werden. Die Tatsache, dass alle FSHR-LHR-Varianten ohne HA-Epitop in Anwesenheit von FSH ausgeprägte cAMP-Spiegel auslösten, deutet auf eine hohe Rezeptoraktivität dieser Chimären hin. Allerdings konnte aufgrund des fehlenden HA-Epitops keine Quantifizierung des Zelloberflächen-„Targeting“ erfolgen, sodass eine exakte Bestimmung der Rezeptoraktivität dieser Chimären nicht möglich war. Die Beobachtung, dass TSH und FSH spezifisch an ihre jeweilige EZD in den Rezeptorchimären binden können und danach über die LHR-Transmembrandomäne eine vermehrte G-Proteinkopplung erfolgt, bestätigt bereits publizierte Daten. In Untersuchungen von Braun et al. zeigten analoge TSHR-LHR-Varianten ähnliche Effekte nach TSH-Stimulation (Braun et al., 1991). Diese Beobachtungen sind erstaunlich, da die Extrazellulärdomänen der Glykoproteinhoron-Rezeptoren hinsichtlich ihrer primären Aminosäuresequenz untereinander nur zu 40% homolog sind. Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Faltung und Konformation der EZD aller Glykoproteinhoron-Rezeptoren ähnlich ist (Fan & Hendrickson, 2005 (a) (b)). Dies könnte die Kompatibilität der EZD innerhalb der Glykoproteinhoron-Rezeptoren in Bezug auf eine hormonvermittelte Rezeptoraktivierung erklären.

Die Analyse der basalen Rezeptoraktivitäten ergab, dass die TSHR-LHR-Chimären mit den zuvor erwähnten TMD-Mutationen gegenüber den entsprechenden Varianten des Wildtyp-LHR eine deutlich erniedrigte Aktivität aufwiesen (Abb. 4.4.2D und Tab. 8.2). Eine Ausnahme bildete die D578H-Mutation. Wie beim N-terminal verkürzten LHR (V2LHR) löste diese Mutation in der TSHR-LHR-Variante eine

konstitutive Rezeptoraktivität aus, welche die Aktivität des Wildtyp-LHR mit gleicher Mutation sogar übertraf. Gegenüber dem verkürzten LHR zeigten alle aktivierenden Mutationen in der TSHR-LHR-Variante eine größere Effektivität. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die TSHR-EZD in Bezug auf eine ligandenunabhängige Aktivierung einen anderen Einfluss auf die TMD des LHR wie die arteigene EZD ausübt. Hierfür kann es folgende Gründe geben:

- 1) Die TSHR-EZD induziert als inverser Agonist eine inaktive Konformation der TMD und verringert den Effekt der meisten aktivierenden und in der LHR-TMD lokalisierten Mutationen.
- 2) Aufgrund von Unterschieden in der Aminosäuresequenz von LHR- und TSHR-EZD ist die TSHR-EZD nur partiell fähig, eine TMD-Konformation zu stabilisieren, die für aktivierende Mutationen empfänglich ist.

Rückschlüsse auf die basalen Rezeptoraktivitäten der FSHR-LHR-Varianten können nur bedingt gezogen werden. Anhand der Daten bezüglich der basalen rezeptorvermittelten cAMP-Spiegel in COS7-Zellen (Abb. 4.4.3B und Tab. 8.2) kann vermutet werden, dass FSHR-LHR-Varianten gegenüber den TSHR-LHR-Varianten mit jeweils der gleichen aktivierenden Mutation eine höhere Rezeptoraktivität aufweisen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gegenüber den TSHR-LHR-Chimären deutlich erhöhten cAMP-Spiegel auf eine stärkere Zelloberflächenexpression der FSHR-LHR-Varianten in COS7-Zellen zurückzuführen sind. Auch ist es möglich, dass die aktivierenden TMD-Mutationen in der FSHR-LHR-Variante ähnlich hohe Rezeptoraktivitäten hervorrufen wie im Wildtyp-LHR, diese allerdings aufgrund des geringen Zelloberflächen-„Targeting“ der FSHR-LHR-Chimären in cAMP-Akkumulationsassays nicht deutlich wird. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die FSHR-EZD der FSHR-LHR-Varianten wie die TSHR-EZD nach Bindung von FSH bzw. TSH eine vermehrte G-Proteinkopplung der LHR-TMD hervorrufen. Die erhobenen Daten zeigen, dass die EZD des TSHR nicht in der Lage ist, die native LHR-EZD komplett funktionell zu ersetzen. Bezüglich des Effektes der FSHR-EZD auf eine aktive Konformation der LHR-Transmembrandomäne ist aufgrund der fehlenden Zelloberflächenexpressionsdaten kein endgültiges Urteil möglich. Sollten die „Zellmembran-Trafficking“-Eigenschaften der FSHR-LHR-Varianten nicht extrem von derjenigen des Wildtyp-LHR abweichen, so ließe sich aufgrund der höheren cAMP-Spiegel der FSHR-LHR-Varianten exprimierenden Zellen im Vergleich zu den TSHR-LHR-Chimären exprimierenden Zellen ableiten, dass die EZD des FSHR in einem größeren Maß die LHR-EZD funktionell ersetzen kann als die TSHR-EZD. Diese

Annahme wäre im Einklang mit Ergebnissen von Sequenzanalysen, wonach der LHR und FSHR eine leicht höhere Homologie untereinander aufweisen als LHR und TSHR (Vassart et al., 2004). Allerdings kommt eine für diese Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse der Extrazellulärdomänen von LGR zu einem anderen Ergebnis (Abb. 1.4.2). Hiernach sind die EZD des TSHR und des LHR zueinander homologer als die EZD von LHR und FSHR.

In den bisherigen Untersuchungen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EZD intakt oder weitestgehend unversehrt sein muss, um eine durch das Hormon hervorgerufene, aktive Rezeptorkonformation stabilisieren zu können. Nun lag die Schlussfolgerung nahe, dass die native EZD, um einen durch aktivierende Mutationen herbeigeführten, aktiven Rezeptorzustand unterstützen zu können, ebenfalls intakt sein müsste. Tatsächlich war für Hormon-Rezeptor-Varianten mit aktivierenden Mutationen sowie einer unvollständigen EZD (z. B. CG $\beta$  $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244-D564G) im Vergleich zu der jeweiligen Hormon-Rezeptor-Variante mit intakter EZD (z. B. CG $\beta$  $\alpha$ -LHR wt-D564G) eine drastisch verringerte Rezeptoraktivität festzustellen (Abb. 4.5.1C und Tab. 8.3). Bei den Hormon-Rezeptor-Varianten mit unvollständiger EZD waren bestimmte Bereiche der LRR-Domäne entfernt worden. Es muss demnach angenommen werden, dass insbesondere Deletionen in der LRR-Domäne mit einer Fehlfaltung der gesamten LHR-EZD einhergehen. Diese Fehlfaltung der EZD bewirkt eine Konformationsänderung der Transmembranhelices, sodass dort lokalisierte aktivierende Mutationen ihre Wirkung über Ausbildung bzw. Bruch von interhelikalen Bindungen nicht mehr entfalten können. Diese Beobachtung lässt nur den Schluss zu, dass eine intakte EZD in engem räumlichen Kontakt zur TMD stehen muss und über bestimmte Kontaktpunkte mit der TMD eine Art Präkonformation der TMD induziert, die das Einwirken von dort lokalisierten aktivierenden Mutation begünstigt. Aufgrund der Daten zu den LRR-Deletionsmutanten können möglicherweise Bereiche der LRR-Domäne als Interaktionspartner für die TMD und den dazugehörigen Extrazellulärschleifen dienen. Auch besteht die Möglichkeit, dass Kontaktpunkte in anderen Bereichen der EZD zu finden sind, wobei die Deletion von LRR eine Wechselwirkung dieser Kontaktpunkte mit der EZD verhindert. Allgemein muss angenommen werden, dass potentielle Kontaktpunkte zwischen EZD und TMD folgende Kriterien erfüllen müssen:

- 1) Bestimmte Aminosäuren oder Bereiche, die als Interaktionspartner in Frage kommen, müssen innerhalb der Glykoproteinhormon-Rezeptoren konserviert sein.

- 2) Solche Aminosäuren bzw. Bereiche dürfen nicht durch das gebundene Hormon verdeckt sein.
- 3) Weiterhin kann vermutet werden, dass in der EZD lokalisierte TMD-Interaktionspartner auf der konkaven, dem Hormon zugewandten Seite der EZD lokalisiert sind.

Die Daten mehrerer Studien deuten darauf hin, dass in der *Hinge Region* des LHR Interaktionspunkte der EZD zur TMD lokalisiert sind (Alvarez et al., 1999; Moyle et al., 2004). Ryu et al. konnten über Aminosäuresubstitutionen in der Extrazellulärschleife-3 (EL-3) zeigen, dass eine Beteiligung der EL-3 an einer ligandenabhängigen Rezeptoraktivierung wahrscheinlich ist (Ryu et al., 1996). Unsere Daten sind im Einklang mit diesen Hypothesen. Dagegen können die Beobachtungen, wonach die *Hinge Region* über Wechselwirkungen mit der Extrazellulärschleife-2 die Transmembranhelices in einer inaktiven Konformation hält (Zeng et al., 2001; Nishi et al., 2002), durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Falls die *Hinge Region* im LHR über Interaktion mit EL-2 tatsächlich die TMD in einem inaktiven Zustand hielte, so müsste ein Entfernen der *Hinge Region* die Interaktion unterbinden und eine hohe basale Rezeptoraktivität auslösen. In unseren Versuchen zeigen die V2LHR-Varianten, denen die *Hinge Region* fehlt, keine erhöhten basalen Rezeptoraktivitäten. Eine Ausnahme bildet die Variante V2LHR-D578H, da sie eine stark aktivierende TMD-Mutation zu enthalten scheint.

## 5.5 Abschließendes Rezeptormodell für den LHR

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wird folgender Aktivierungsmechanismus für den LHR aufgestellt:

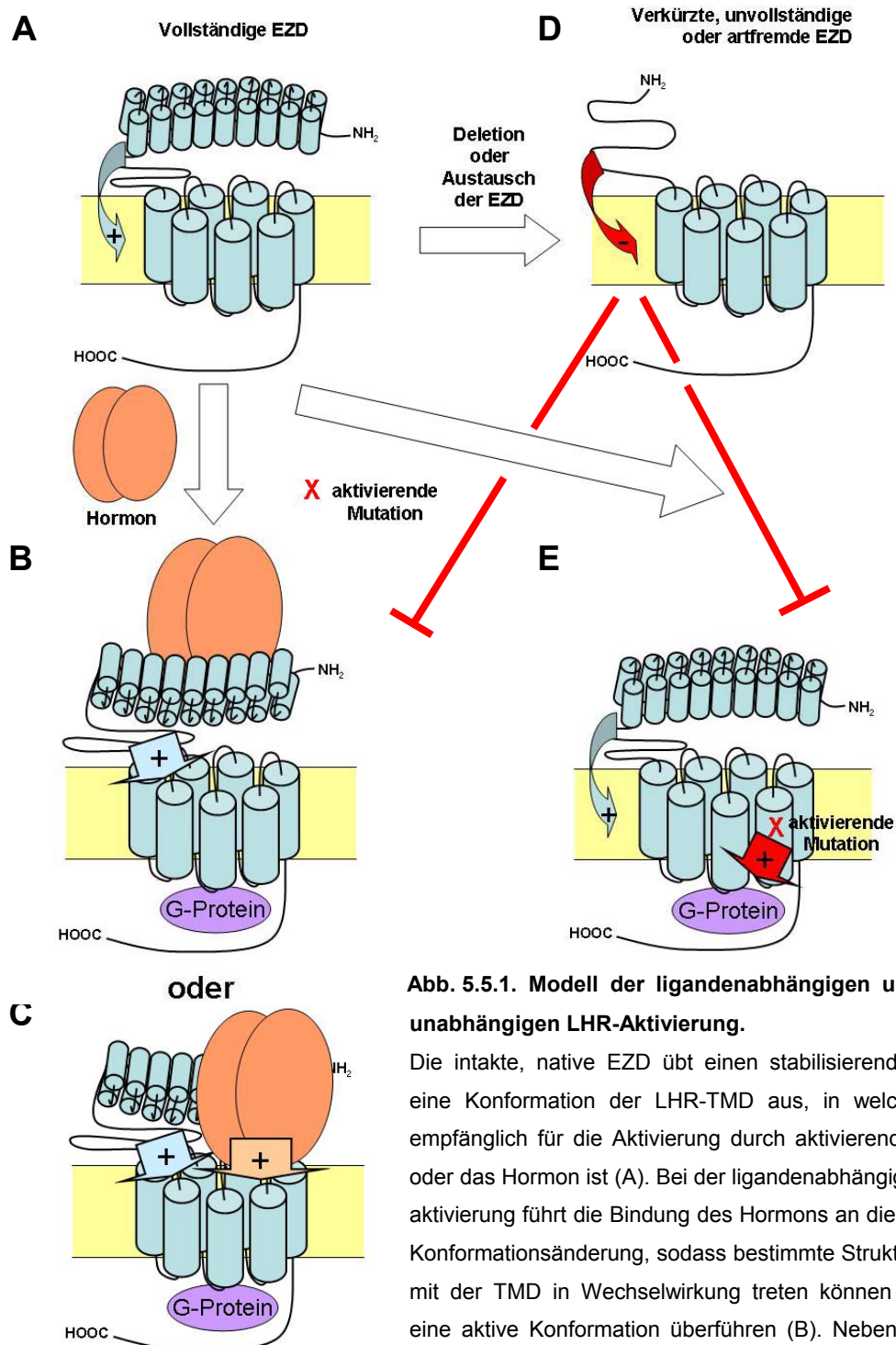
Neben der Funktion der Ligandenbindung übt die intakte, native EZD einen stabilisierenden Effekt auf eine Konformation der TMD aus, in welcher der LHR empfänglich für die Aktivierung durch aktivierende Mutationen oder das Hormon ist (Abb. 5.5.1A). D. h. eine intakte, native LHR-EZD induziert einen „aktivierungsfähigen“ Zustand der TMD. Bei der ligandenabhängigen Rezeptoraktivierung führt die Bindung des Hormons an die EZD zu einer Konformationsänderung, sodass bestimmte Strukturen der EZD mit der TMD in Wechselwirkung treten können und die TMD in eine aktive Konformation überführen (Abb. 5.5.1B). Aufgrund unserer Versuchsergebnisse können die LRR als intramolekulare agonistische Struktur ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist in der *Hinge Region* der EZD eine Struktur lokalisiert, die als

intramolekularer Agonist mit der TMD in Wechselwirkung tritt. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt (Alvarez et al., 1999; Moyle et al., 2004; Bruysters et al., 2008). Neben der EZD als intramolekularen Agonisten ist während des ligandenvermittelten Aktivierungsprozesses eine gleichzeitige Wechselwirkung des Hormons mit der TMD vorstellbar (Abb. 5.5.1C).

Bei der ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung induziert eine intakte, native EZD eine „aktivierungsfähige“ TMD, in der aktivierende Rezeptormutationen ihre volle Wirkung entfalten können (Abb. 5.5.1E). Durch Austausch der LHR-EZD gegen eine artfremde EZD oder durch Deletion von Aminosäuren geht der stabilisierende Charakter der EZD auf die „aktivierungsfähige“ Konformation der TMD verloren (Abb. 5.5.1D). Aktivierende Mutationen bzw. das Hormon führen nicht mehr zur (vollständigen) Aktivierung des LHR.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle der Extrazellulärdomäne innerhalb des Aktivierungsprozesses von Glykoproteinhormon-Rezeptoren. Anhand der Untersuchungen zu dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die EZD nicht ausschließlich für die Bindung des Hormons verantwortlich ist, sondern darüber hinaus einen erheblichen Beitrag zur Induktion eines aktiven Rezeptorzustandes leistet. Hierbei scheint für die Unterstützung einer aktiven Rezeptorkonformation eine weitestgehend intakte EZD notwendig zu sein. Des Weiteren liefert die Studie Erkenntnisse dafür, dass die EZD und die TMD entgegen der vorherrschenden Meinung strukturell und funktionell keine unabhängigen Rezeptorbausteine darstellen. In der Regel muss innerhalb des Aktivierungsprozesses eine Wechselwirkung von der EZD mit der G-Protein koppelnden TMD erfolgen.





**Abb. 5.5.1. Modell der ligandenabhängigen und ligandenunabhängigen LHR-Aktivierung.**

Die intakte, native EZD übt einen stabilisierenden Effekt auf eine Konformation der LHR-TMD aus, in welcher der LHR empfänglich für die Aktivierung durch aktivierende Mutationen oder das Hormon ist (A). Bei der ligandenabhängigen Rezeptoraktivierung führt die Bindung des Hormons an die EZD zu einer Konformationsänderung, sodass bestimmte Strukturen der EZD mit der TMD in Wechselwirkung treten können und diese in eine aktive Konformation überführen (B). Neben der EZD als intramolekularer Agonist ist während des ligandenvermittelten

Aktivierungsprozesses eine gleichzeitige Wechselwirkung des Hormons mit der TMD vorstellbar (C). Durch den ausgeprägten stabilisierenden Effekt einer intakten, nativen EZD auf eine „aktivierungsfähige“ TMD können bei einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung aktivierende Mutationen ihre volle Wirkung entfalten (E). Durch Austausch der LHR-EZD gegen eine artfremde EZD oder durch Deletion von Aminosäuren geht der stabilisierende Charakter der EZD auf die TMD verloren (D). Aktivierende Mutationen bzw. das Hormon führen nicht mehr zur (vollständigen) Aktivierung des LHR.

## 5.6 Ausblick

Diese Arbeit hat wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus des LH-Rezeptors geliefert. Endgültige Klarheit bezüglich der räumlichen Anordnung der EZD, der TMD sowie des gebundenen Liganden zueinander während des Aktivierungsprozesses wird wahrscheinlich erst eine Kristallstruktur aus allen drei Einheiten bringen. Folgende Faktoren erschweren allerdings eine Kristallisation von GPCR wie beispielsweise des LHR (Serrano-Vega et al., 2008; Rosenbaum et al., 2009): 1) Die geringe thermodynamische Stabilität einiger GPCR (z. B.  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor); 2) der hohe lipophile Anteil der TMD von GPCR; 3) die Gefahr einer schnellen Proteolyse und 4) die geringe Expression vieler GPCR in nativen Geweben. Eine Kristallisierung von GPCR stellt daher eine große Herausforderung dar, die meist nur durch bestimmte Bedingungen oder eine Modifikation des Rezeptormoleküls zu erreichen ist. Über die Bindung von inversen Agonisten bzw. Antagonisten, welche die Rezeptorkonformation stabilisieren, konnten beispielsweise  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren sowie der  $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor kristallisiert werden (Rasmussen et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Rosenbaum et al., 2009). Über andere Methoden, welche die Thermostabilität der Rezeptoren erhöhten bzw. deren Proteolyse verhinderten, konnten ebenfalls  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren sowie der  $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor kristallisiert werden (Rosenbaum et al., 2009). Inwiefern die genannten Methoden ebenfalls zu einer erfolgreichen Kristallisation eines kompletten Glykoproteinhormon-Rezeptors führen, bleibt abzuwarten.

Aufgrund der Tatsache, dass Glykoproteinhormon-Rezeptoren im Gegensatz zu adrenergen Rezeptoren oder Adenosin-Rezeptoren von sehr großen Liganden aktiviert werden, und darüber hinaus Glykoproteinhormon-Rezeptoren über eine deutlich längere EZD verfügen als die übrigen GPCR der Subfamilie A, können Erkenntnisse aus Kristallstrukturen der übrigen Vertreter der Subfamilie A nur bedingt auf Glykoproteinhormon-Rezeptoren übertragen werden. Eine Kristallstruktur speziell zu einem Glykoproteinhormon-Rezeptor liegt ausschließlich für den FSHR vor. Fan & Hendrickson ist es gelungen, den Komplex aus hFSH und dem N-terminalen Bereich der FSHR-EZD zu kristallisieren (Fan & Hendrickson, 2005 (b)). Allerdings enthielt dieser Komplex nicht die komplette EZD und ebenfalls keine TMD des FSHR, sodass die relative Anordnung von Hormon, EZD und TMD zueinander während des Aktivierungsprozesses weiterhin nicht endgültig geklärt ist. Die erfolgreiche Kristallisierung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren sowie des  $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptors mit Hilfe neuer Kristallisierungsstrategien geben Grund zur Hoffnung, dass

in naher Zukunft ebenfalls die Kristallstruktur des gesamten LHR oder eines anderen Glykoprotein-hormon-Rezeptors vorliegen wird. Hierbei wäre die Kristallstruktur des gesamten LHR zusammen mit dem nativen Liganden hCG hinsichtlich der Entschlüsselung des Aktivierungsmechanismus am hilfreichsten.

Durch Hochdurchsatz-Screening („High-throughput screening“) konnten vor kurzem Substanzen mit einem kleinen Molekulargewicht identifiziert werden, die agonistisch bzw. antagonistisch am LHR wirken (van Straten et al., 2002; Jorand-Lebrun et al., 2007; Heitman et al., 2008; van Koppen et al., 2008; Bonger et al., 2009; van de Lagemaat et al., 2009). Diese niedermolekularen Substanzen haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu potentiellen therapeutisch einsetzbaren Antikörpern oder Hormon-Analoga relativ günstig in großen Mengen hergestellt werden können und nach oraler Gabe meist in ausreichenden Mengen an den Wirkort gelangen. Eine dieser Substanzen hat bereits gezeigt, dass sie nach oraler Applikation eine Ovulation in Ratten und Mäusen auslösen kann sowie die Testosteron-Produktion in männlichen Ratten induziert (van de Lagemaat et al., 2009). Bisher ist nicht eindeutig geklärt, an welcher Stelle diese Substanzen an den LHR binden. Es wird vermutet, dass sie durch Wechselwirkung mit der TMD den LH-Rezeptor aktivieren bzw. inaktivieren. Die Kristallstruktur einer dieser Substanzen zusammen mit dem LHR könnte hier neue Erkenntnisse liefern. Sofern die identifizierten Substanzen in einem klinischen Programm ihre Tauglichkeit und Wirksamkeit nicht bestätigen sollten, könnte eine zukünftig vorhandene Kristallstruktur des LHR beim virtuellen Screening sowie der *de novo*-Synthese von weiteren therapeutisch wirksamen Substanzen mit einem Potenzial zum klinischen Einsatz helfen. Neben dem Hochdurchsatz-Screening stellen nämlich das virtuelle Screening sowie die *de novo*-Synthese Methoden zur Identifizierung bzw. Herstellung von therapeutisch wirksamen Substanzen dar (Schneider & Fechner, 2005; Klebe, 2006).

## 6 Zusammenfassung

Der Lutropin/Choriongonadotropin-Rezeptor (LHR) sowie die übrigen Glykoprotein-hormon-Rezeptoren, Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) und Follitropin-Rezeptor (FSHR), stellen Vertreter der rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Glykoprotein-hormon-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei Wachstum und Funktion der Gonaden sowie der Schilddrüse. Genetische Veränderungen in diesen Rezeptoren können die Ursache für endokrinologische Erkrankungen wie z. B. Pubertas praecox oder Leydigzell-Hypoplasie darstellen. Um Strategien zur Behandlung dieser Erkrankungen entwickeln zu können, ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Aktivierung dieser Rezeptoren essentiell.

In der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der Extrazellulärdomäne (EZD) innerhalb des Aktivierungsprozesses des LHR untersucht worden. Hierfür sind LHR mit Hilfe gentechnischer Methoden verändert und in einem heterologen Expressionssystem hinsichtlich ihres Zelloberflächen-„Targeting“ und ihrer Signaltransduktions-eigenschaften untersucht worden.

Die funktionelle Analyse von N-terminal modifizierten LHR ergab, dass die EZD, entgegen Berichten zum nahe verwandten TSHR, nicht als intramolekularer inverser Agonist auf die Transmembrandomäne (TMD) wirkt, sondern vielmehr einen Beitrag zu einem aktiven Rezeptorzustand des LHR leistet. Das Entfernen oder Verkürzen der EZD resultiert in Rezeptoren, die im Vergleich zum Wildtyp-LHR eine erniedrigte basale Rezeptoraktivität aufweisen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die meisten natürlich vorkommenden TMD-Mutationen, die beim Wildtyp-LHR eine deutlich erhöhte Rezeptoraktivität hervorrufen, in LHR ohne EZD nicht aktiv sind. Weitere Versuche zeigten, dass die EZD des LHR nicht ausreichend durch die EZD anderer Glykoprotein-hormon-Rezeptoren funktionell ersetzt werden kann. Nach Austausch der arteigenen EZD gegen die EZD des TSHR konnten natürlich vorkommende, in der TMD des LHR lokalisierte, aktivierende Mutationen nicht ihre volle Wirkung entfalten und in den meisten Fällen keinen ausgeprägten aktiven Rezeptorzustand hervorrufen. Die EZD des nahe verwandten TSHR scheint entweder als inverser Agonist auf die LHR-TMD zu wirken oder ist aufgrund von Unterschieden in der Aminosäuresequenz zur LHR-EZD nicht in der Lage, eine aktive LHR-Konformation, die für aktivierende Mutationen empfänglich ist, zu unterstützen.

Über Ligand-Rezeptor-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass eine intakte LHR-EZD für eine ligandenvermittelte Rezeptoraktivität zwingend notwendig ist und dass das Hormon *per se* keine Rezeptoraktivierung induzieren kann. Weitere Versuchsergebnisse bestätigten die Hypothese, dass die LHR-EZD – und speziell die LRR-Domäne – intakt sein muss, damit die EZD eine durch das Hormon oder Mutationen hervorgerufene aktive Rezeptorkonformation unterstützen kann.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse bezüglich der Rolle der EZD innerhalb des Aktivierungsprozesses von Glykoproteinhormon-Rezeptoren. Anhand der Untersuchungen zu dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die EZD nicht ausschließlich für die Bindung des Hormons verantwortlich ist, sondern darüber hinaus einen erheblichen Beitrag zur Induktion eines aktiven Rezeptorzustandes leistet. Des Weiteren liefert die Arbeit Erkenntnisse dafür, dass die EZD und die TMD entgegen der vorherrschenden Meinung keine strukturell und funktionell unabhängigen Rezeptorbausteine darstellen. In der Regel muss innerhalb des Aktivierungsprozesses eine Wechselwirkung von der EZD mit der G-Protein-koppelnden TMD erfolgen.

## 7 Summary

Glycoprotein hormone receptors such as the lutropin/chorionic gonadotropin receptor (LHR), the thyrotropin receptor (TSHR) and the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) are members of the rhodopsin-like G-protein coupled receptor superfamily and play a pivotal role in growth and function of the gonads and the thyroid gland. Gain-of-function mutations in glycoprotein hormone receptor genes are frequently associated with endocrine dysfunctions such as testicular disorders. A detailed understanding of the mechanism of glycoprotein hormone receptor activation is mandatory for the development of new pharmacological strategies for therapeutic intervention of such dysfunctions.

In the present study, the role of the EZD for the activation of the LHR was examined. Genetically modified LHR were designed and functionally analyzed in a heterologous expression system by determining receptor protein expression and insertion into the cell membrane as well as receptor-dependent basal and agonist-induced cAMP accumulation.

Functional analysis revealed that the LHR-EZD does not function as an inverse agonist but contributes to an active receptor conformation. Partial or total deletion of the EZD resulted in LHR with decreased basal receptor activity when compared to the wildtype LHR. Furthermore, most naturally occurring TMD-mutations which induce high ligand-independent receptor activity in the wildtype LHR, were not active in EZD-deficient LHR. Additional experiments revealed that the LHR-EZD cannot fully functionally be replaced by the EZD of the closely related TSHR, since swapping of the EZD in the LHR for the EZD of the TSHR impaired the activity of naturally occurring activating TMD-mutations. There may be two reasons for this observation: Firstly, the EZD of the TSHR serves as an inverse agonist constraining the LHR-TMD in an inactive conformation, or secondly, due to primary sequence differences between the LHR- and the TSHR-EZD, the TSHR-EZD is not capable to support an LHR-TMD conformation susceptible to activating mutations.

The data observed for ligand-receptor chimeras indicate that an intact LHR-EZD is required for ligand-dependent receptor activation and that the hormone *per se* is unable to activate the TMD of the LHR. Additional experiments support the notion that the integrity of the EZD, particularly the intactness of the LRR domain, is a prerequisite

---

for the ability of the LHR-EZD to support an active receptor conformation induced by the hormone and activating mutations.

Altogether, this study provides new insights in the role of the EZD in the activation process of glycoprotein hormone receptors. The data observed in this study strengthen the concept of a major contribution of the LHR-EZD in the activation mechanism apart from hormone binding and provide evidence for a cooperative model with structural and functional interactions of the EZD and the TMD. Thus, our study challenges the prevailing concept that the hormone-binding ECD and the G protein-coupling TMD are structurally and functionally independent modules of glycoprotein hormone receptors.

## 8 Anhang

**Tab. 8.1. Übersicht der in dieser Studie untersuchten LHR-Varianten.**

Die Tabelle zeigt die Modifikationen der verschiedenen LHR-Varianten. Die entfernten und noch vorhandenen LHR-Aminosäuresequenzen sowie weitere Modifikationen sind in der Tabelle aufgeführt. aa, Aminosäure; +, HA-Epitop vorhanden; –, HA-Epitop fehlt.

LHR-Variante	entfernte Aminosäuresequenz des hLHR	hLHR-Aminosäuresequenz in der Variante	HA-Epitop	Charakteristische Modifikationen
LHR wt	—	1–699	+	—
LHR–L457R	—	1–699	+	L457R
LHR–D564G	—	1–699	+	D564G
LHR–D578H	—	1–699	+	D578H
LHR–D578Y	—	1–699	+	D578Y
V2LHR	1–353	354–699	+	—
V2hingeLHR	1–269	270–699	+	—
V2LHR–L457R	1–353	354–699	+	aa 1–39 des V <sub>2</sub> R + L457R
V2LHR–D564G	1–353	354–699	+	aa 1–39 des V <sub>2</sub> R + D564G
V2LHR–D578H	1–353	354–699	+	aa 1–39 des V <sub>2</sub> R + D578H
V2LHR–D578Y	1–353	354–699	+	aa 1–39 des V <sub>2</sub> R + D578Y
TSHR wt	—	—	+	aa 1–764 des hTSHR
TSHR–LHR	1–358	359–699	+	aa 1–413 des hTSHR
TSHR–LHR–L457R	1–358	359–699	+	aa 1–413 des hTSHR + L457R
TSHR–LHR–D564G	1–358	359–699	+	aa 1–413 des hTSHR + D564G
TSHR–LHR–D578H	1–358	359–699	+	aa 1–413 des hTSHR + D578H
TSHR–LHR–D578Y	1–358	359–699	+	aa 1–413 des hTSHR + D578H
FSHR wt	—	—	–	aa 1–695 des hFSHR
FSHR–LHR	1–358	359–699	–	aa 1–361 des hFSHR
FSHR–LHR–L457R	1–358	359–699	–	aa 1–361 des hFSHR + L457R
FSHR–LHR–D564G	1–358	359–699	–	aa 1–361 des hFSHR + D564G
FSHR–LHR–D578H	1–358	359–699	–	aa 1–361 des hFSHR + D578H
FSHR–LHR–D578Y	1–358	359–699	–	aa 1–361 des hFSHR + D578Y
HA-FSHR wt	—	—	+	aa 1–695 des hFSHR
HA-FSHR–LHR	1–358	359–699	+	aa 1–361 des hFSHR
HA-FSHR–LHR–L457R	1–358	359–699	+	aa 1–361 des hFSHR + L457R
HA-FSHR–LHR–D564G	1–358	359–699	+	aa 1–361 des hFSHR + D564G



Tab. 8.1. Fortsetzung.

LHR-Variante	entfernte Aminosäuresequenz des hLHR	hLHR-Aminosäuresequenz in der Variante	HA-Epitop	Charakteristische Modifikationen
HA-FSHR-LHR-D578H	1–358	359–699	+	aa 1–361 des hFSHR + D578H
HA-FSHR-LHR-D578Y	1–358	359–699	+	aa 1–361 des hFSHR + D578Y
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR wt	1–26	27–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR wt-D564G	1–26	27–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D564G
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR wt-D578H	1–26	27–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578H
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR wt-D578Y	1–26	27–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578Y
CG $\beta$ $\alpha$ -V2LHR	1–353	354–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -V2hingeLHR	1–269	270–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -V2LGR7LHR	1–353	354–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + aa 108–404 des hLGR7
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100–124	1–26; 100–124	27–99; 125–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–223	1–26; 199–223	27–198; 224–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–223–D564G	1–26; 199–223	27–198; 224–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D564G
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–223–D578H	1–26; 199–223	27–198; 224–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578H
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–223–D578Y	1–26; 199–223	27–198; 224–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578Y
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244	1–26; 199–244	27–198; 245–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244–D564G	1–26; 199–244	27–198; 245–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D564G
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244–D578H	1–26; 199–244	27–198; 245–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578H
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–244–D578Y	1–26; 199–244	27–198; 245–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$ + D578Y
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa245–267	1–26; 245–267	27–244; 268–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa224–267	1–26; 224–267	27–223; 268–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$
CG $\beta$ $\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199–267	1–26; 199–267	27–198; 268–699	+	mit CG $\beta$ $\alpha$

**Tab. 8.2. Funktionelle Untersuchungen von verschiedenen N-terminal modifizierten LHR-Varianten ohne angebundenem hCG.**

Die funktionellen Untersuchungen der N-terminal modifizierten LHR-Varianten wurden wie in Kapitel 3 beschrieben durchgeführt. Basale cAMP-Akkumulationen und cAMP-Spiegel nach Stimulation mit 1  $\mu$ M hCG ( $\times$ ), 100 mU/ml pTSH (\*) oder 100 mU/ml hFSH (\*) sind als Vielfaches vom Basalwert von LHR wt-exprimierenden Zellen dargestellt. Die Bestimmung der Zelloberflächenexpressionsrate der Rezeptoren erfolgte mittels ELISA bei einer Wellenlänge von 450 nm, wobei die Rezeptordichten als Prozent der Dichten von LHR wt angegeben sind. Basale und agonistenabhängige spezifische Rezeptoraktivitäten (SRA) jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und der rezeptorabhängigen Zelloberflächenexpressionsrate gebildet wurde. Der Messwert der Oberflächenexpressionssignals von LHR wt wurde dabei gleich 1 gesetzt und die Signale der übrigen Rezeptorvarianten umgerechnet. Alle Zahlenwerte sind als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei in einem Versuch für jede Variante eine Doppel- (cAMP-Akkumulationsassay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgte. NN, nicht nachweisbar.

Rezeptor-Variante	cAMP-Akkumulation (-fach über LHR wt basal)		Zellober- flächen- expression (% von LHR wt)	Spezifische Rezeptoraktivität (SRA)	
	basal	Agonist		basal	Agonist
LHR wt	1	17,6 $\pm$ 1,3 <sup>x</sup>	100	1	17,6 $\pm$ 1,3
LHR-L457R	10,1 $\pm$ 1,8	10,6 $\pm$ 1,8 <sup>x</sup>	113,3 $\pm$ 13,2	8,9 $\pm$ 1,6	9,4 $\pm$ 1,6
LHR-D564G	5,9 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,7 <sup>x</sup>	22,0 $\pm$ 11,1	26,8 $\pm$ 2,5	44,1 $\pm$ 3,0
LHR-D578H	8,0 $\pm$ 1,2	10,2 $\pm$ 2,6 <sup>x</sup>	119,5 $\pm$ 10,6	6,7 $\pm$ 1,0	8,5 $\pm$ 2,2
LHR-D578Y	10,4 $\pm$ 1,1	14,1 $\pm$ 2,2 <sup>x</sup>	153,5 $\pm$ 12,5	6,7 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 1,5
V2LHR	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>x</sup>	69,6 $\pm$ 13,9	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2
V2hingeLHR	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0 <sup>x</sup>	51,8 $\pm$ 3,7	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
V2LHR-L457R	2,2 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3 <sup>x</sup>	52,9 $\pm$ 23,9	4,2 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,6
V2LHR-D564G	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>x</sup>	59,8 $\pm$ 10,6	1,7 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2
V2LHR-D578H	8,2 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,5 <sup>x</sup>	98,1 $\pm$ 14,4	8,4 $\pm$ 0,6	9,9 $\pm$ 0,5
V2LHR-D578Y	2,0 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>x</sup>	131,5 $\pm$ 12,9	1,5 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,0
TSHR wt	1,3 $\pm$ 0,2	12,9 $\pm$ 2,6 <sup>*</sup>	502,0 $\pm$ 15,0	0,3 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,5
TSHR-LHR	0,8 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,7 <sup>*</sup>	44,6 $\pm$ 3,4	1,7 $\pm$ 0,4	16,1 $\pm$ 1,5
TSHR-LHR-L457R	4,6 $\pm$ 1,0	6,2 $\pm$ 0,6 <sup>*</sup>	88,2 $\pm$ 5,6	5,2 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 0,7
TSHR-LHR-D564G	1,6 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>	34,3 $\pm$ 6,5	4,8 $\pm$ 0,3	11,3 $\pm$ 0,7
TSHR-LHR-D578H	8,8 $\pm$ 0,5	11,1 $\pm$ 0,8 <sup>*</sup>	73,5 $\pm$ 9,4	12,0 $\pm$ 0,7	15,1 $\pm$ 1,1
TSHR-LHR-D578Y	4,3 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 1,4 <sup>*</sup>	120,6 $\pm$ 9,2	3,5 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 1,2
FSHR wt	0,7 $\pm$ 0,1	8,7 $\pm$ 0,5 <sup>*</sup>	—	—	—
FSHR-LHR	0,8 $\pm$ 0,0	9,6 $\pm$ 1,5 <sup>*</sup>	—	—	—
FSHR-LHR-L457R	10,5 $\pm$ 2,1	8,7 $\pm$ 1,6 <sup>*</sup>	—	—	—
FSHR-LHR-D564G	3,9 $\pm$ 1,1	7,8 $\pm$ 2,2 <sup>*</sup>	—	—	—
FSHR-LHR-D578H	9,7 $\pm$ 1,4	9,4 $\pm$ 0,9 <sup>*</sup>	—	—	—
FSHR-LHR-D578Y	6,7 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 2,1 <sup>*</sup>	—	—	—
HA-FSHR wt	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0 <sup>*</sup>	NN	—	—
HA-FSHR-LHR	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0 <sup>*</sup>	NN	—	—
HA-FSHR-LHR-L457R	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0 <sup>*</sup>	NN	—	—

HA-FSHR-LHR-D564G	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,0^*$	NN	—	—
HA-FSHR-LHR-D578H	$1,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2^*$	NN	—	—
HA-FSHR-LHR-D578Y	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1^*$	NN	—	—

**Tab. 8.3. Funktionelle Untersuchungen von verschiedenen Hormon-Rezeptor-Varianten.**

Die funktionellen Untersuchungen wurden wie in Kapitel beschrieben durchgeführt. Basale cAMP-Akkumulationen und cAMP-Spiegel nach Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  hCG ( $^x$ ) sind als Vielfaches vom Basalwert des Wildtyp-LHR (LHR wt) dargestellt. Die Bestimmung der Zelloberflächenexpression der Rezeptoren erfolgte mittels ELISA, wobei die Rezeptordichten als Prozent der Dichten von  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt angegeben sind. Basale und agonistenabhängige spezifische Rezeptoraktivitäten (SRA) jeder Variante wurden berechnet, indem der Quotient aus basalem cAMP-Wert und rezeptorabhängiger Zelloberflächenexpression gebildet wurde. Der Messwert der Oberflächenexpression von  $\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt wurde dabei gleich 1 gesetzt und die Oberflächenexpressionswerte der übrigen LHR-Varianten umgerechnet. Die Zahlenwerte sind als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von mindestens zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei in einem Versuch für jede Variante eine Doppel- (cAMP-Akkumulationsassay) oder Dreifach-Bestimmung (ELISA) erfolgte.

Rezeptor-Variante	cAMP-Akkumulation (-fach über LHR wt basal)		Zelloberflächen- expression (% von $\text{CG}\beta\alpha$ - LHR wt)	Spezifische Rezeptoraktivität (SRA)	
	basal	Agonist		basal	Agonist
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt	$2,8 \pm 0,2$	$9,4 \pm 1,3^x$	100	$2,8 \pm 0,2$	$9,4 \pm 1,3$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt-D564G	$2,3 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5^x$	$41,4 \pm 9,6$	$5,6 \pm 0,7$	$11,0 \pm 1,2$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt-D578H	$6,5 \pm 1,6$	$7,3 \pm 1,5^x$	$111,4 \pm 14,1$	$5,8 \pm 1,4$	$6,5 \pm 1,4$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR wt-D578Y	$2,5 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,5^x$	$140,2 \pm 12,6$	$1,8 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,4$
$\text{CG}\beta\alpha$ -V2LHR	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^x$	$97,6 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -V2hingeLHR	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1^x$	$78,2 \pm 6,9$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -V2LGR7LHR	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^x$	$67,7 \pm 2,9$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa100-124	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,0^x$	$77,8 \pm 11,6$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,0$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-223	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1^x$	$66,6 \pm 4,3$	$1,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-223-D564G	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^x$	$51,5 \pm 5,0$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-223-D578H	$1,9 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,4^x$	$90,6 \pm 6,5$	$2,1 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,4$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-223-D578Y	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^x$	$77,7 \pm 7,7$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-244	$0,7 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,2^x$	$62,1 \pm 6,6$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-244-D564G	$0,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0^x$	$157,6 \pm 11,4$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-244-D578H	$1,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,5^x$	$78,1 \pm 18,3$	$2,3 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,6$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-244-D578Y	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2^x$	$111,0 \pm 11,8$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa245-267	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1^x$	$52,4 \pm 9,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa224-267	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1^x$	$70,6 \pm 8,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
$\text{CG}\beta\alpha$ -LHR $\Delta$ aa199-267	$0,6 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,1^x$	$70,2 \pm 4,1$	$0,9 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,2$

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### Verwendete Abkürzungen:

A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
A <sub>450</sub>	Absorption bei 450 nm
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (konzentriert)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	Choriongonadotropin
COS7-Zellen	Nierenzellen der Grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
D. h.	das heißt
DIC	Differential interference contrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC <sub>50</sub>	Effektivkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethyldinitrilotetraessigsäure)
EL	Extrazellulärschleife
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZD	Extrazellulärdomäne
FBS	fötales Rinderserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon (Follitropin)
FSHR	FSH-Rezeptor (Follitropin-Rezeptor)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Erdbeschleunigung

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G <sub>s</sub>	stimulatorisches G-Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HA-Epitop	Epitop aus dem Hämagglutinin-Protein des Influenzavirus
hCG	humanes Choriongonadotropin
hFSH	humanes FSH
hLHR	humaner LH/CG-Rezeptor
HRP	Meerrettich-Peroxidase („Horseradish peroxidase“)
hV2R	humaner Vasopressin-V2-Rezeptor
i.d.R.	in der Regel
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	Intrazellulärschleife
I.U.	Internationale Einheit („International Unit“)
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LH	Luteinisierendes Hormon (Lutropin)
LHR	LH/CG-Rezeptor
LRR	Leucine-rich repeats
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min.	Minute
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pTSH	Schweine-TSH
PIPES	Piperazin-N.N'-bis[ethansulfonsäure]
Pos.	Position
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SRA	spezifische Rezeptoraktivität
SV 40	Simian-Virus 40
T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin (Thyroxin)
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
TSHR	TSH-Rezeptor (Thyreotropin-Rezeptor)
U	Einheit („Unit“)
u. a.	unter anderem
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

**Abkürzungen der Basen**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

**Einbuchstaben-Code der Aminosäuren**

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure, Aspartat	P	Prolin
E	Glutaminsäure, Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

## 10 Literaturverzeichnis

- Abell, A. N. & D. L. Segaloff (1997). "Evidence for the direct involvement of transmembrane region 6 of the lutropin/choriogonadotropin receptor in activating Gs." *J Biol Chem* 272(23): 14586-91.
- Agrawal, G. & R. R. Dighe (2009). "Critical involvement of the hinge region of the follicle-stimulating hormone receptor in the activation of the receptor." *J Biol Chem* 284(5): 2636-47.
- Allgeier, A., S. Offermanns, J. Van Sande, K. Spicher, G. Schultz & J. E. Dumont (1994). "The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11." *J Biol Chem* 269(19): 13733-5.
- Alvarez, C. A., P. Narayan, J. Huang & D. Puett (1999). "Characterization of a region of the lutropin receptor extracellular domain near transmembrane helix 1 that is important in ligand-mediated signaling." *Endocrinology* 140(4): 1775-82.
- Angelova, K., F. Fanelli & D. Puett (2002). "A model for constitutive lutropin receptor activation based on molecular simulation and engineered mutations in transmembrane helices 6 and 7." *J Biol Chem* 277(35): 32202-13.
- Angelova, K., F. Fanelli & D. Puett (2008). "Contributions of intracellular loops 2 and 3 of the lutropin receptor in Gs coupling." *Mol Endocrinol* 22(1): 126-38.
- Angelova, K., P. Narayan, J. P. Simon & D. Puett (2000). "Functional role of transmembrane helix 7 in the activation of the heptahelical lutropin receptor." *Mol Endocrinol* 14(4): 459-71.
- Ascoli, M., F. Fanelli & D. L. Segaloff (2002). "The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective." *Endocr Rev* 23(2): 141-74.
- Ashley, R. A., S. M. McGee, P. A. Isotaolo, S. A. Kramer & J. C. Cheville (2007). "Clinical and pathological features associated with the testicular tumor of the adrenogenital syndrome." *J Urol* 177(2): 546-9; discussion 549.
- Barron, A. M., G. Verdile & R. N. Martins (2006). "The role of gonadotropins in Alzheimer's disease: potential neurodegenerative mechanisms." *Endocrine* 29(2): 257-69.
- Ben-Menahem, D. (2004). "Single chain variants of the glycoprotein hormones and their receptors as tools to study receptor activation and for analogue design." *J Neuroendocrinol* 16(2): 171-7.



- Bhowmick, N., J. Huang, D. Puett, N. W. Isaacs & A. J. Lapthorn (1996). "Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling." *Mol Endocrinol* 10(9): 1147-59.
- Biebermann, H., T. Schöneberg, A. Schulz, G. Krause, A. Grüters, G. Schultz & T. Gudermann (1998). "A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling." *Faseb J* 12(14): 1461-71.
- Bonger, K. M., R. J. van den Berg, A. D. Knijnenburg, L. H. Heitman, C. J. van Koppen, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft & G. A. van der Marel (2009). "Discovery of selective luteinizing hormone receptor agonists using the bivalent ligand method." *ChemMedChem* 4(7): 1189-95.
- Bowen, R. L., M. A. Smith, P. L. Harris, Z. Kubat, R. N. Martins, R. J. Castellani, G. Perry & C. S. Atwood (2002). "Elevated luteinizing hormone expression colocalizes with neurons vulnerable to Alzheimer's disease pathology." *J Neurosci Res* 70(3): 514-8.
- Bowen, R. L., G. Verdile, T. Liu, A. F. Parlow, G. Perry, M. A. Smith, R. N. Martins & C. S. Atwood (2004). "Luteinizing hormone, a reproductive regulator that modulates the processing of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta deposition." *J Biol Chem* 279(19): 20539-45.
- Braun, T., P. R. Schofield & R. Sprengel (1991). "Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity." *Embo J* 10(7): 1885-90.
- Bruysters, M., S. Christin-Maitre, M. Verhoef-Post, C. Sultan, J. Auger, I. Faugeron, L. Larue, S. Lumbroso, A. P. Themmen & P. Bouchard (2008). "A new LH receptor splice mutation responsible for male hypogonadism with subnormal sperm production in the propositus, and infertility with regular cycles in an affected sister." *Hum Reprod* 23(8): 1917-23.
- Cetani, F., M. Tonacchera & G. Vassart (1996). "Differential effects of NaCl concentration on the constitutive activity of the thyrotropin and the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors." *FEBS Lett* 378(1): 27-31.
- Cocco, S., A. Meloni, M. G. Marini, A. Cao & P. Moi (1996). "A missense (T577I) mutation in the luteinizing hormone receptor gene associated with familial male-limited precocious puberty." *Hum Mutat* 7(2): 164-6.
- Couture, L., J. J. Remy, H. Rabesona, F. Troalen, E. Pajot-Augy, V. Bozon, T. Haertle, J. M. Bidart & R. Salesse (1996). "A defined epitope on the human

- choriogonadotropin alpha-subunit interacts with the second extracellular loop of the transmembrane domain of the lutropin/choriogonadotropin receptor." *Eur J Biochem* 241(2): 627-32.
- Diaz, A., M. Danon & J. Crawford (2007). "McCune-Albright syndrome and disorders due to activating mutations of GNAS1." *J Pediatr Endocrinol Metab* 20(8): 853-80.
- Dufau, M. L. (1998). "The luteinizing hormone receptor." *Annu Rev Physiol* 60: 461-96.
- Dufau, M. L., T. Tsuruhara, K. A. Horner, E. Podesta & K. J. Catt (1977). "Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3419-23.
- Engvall, E., K. Jonsson & P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes." *Biochim Biophys Acta* 251(3): 427-34.
- Enkhbayar, P., M. Kamiya, M. Osaki, T. Matsumoto & N. Matsushima (2004). "Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins." *Proteins* 54(3): 394-403.
- Evans, B. A., D. J. Bowen, P. J. Smith, P. E. Clayton & J. W. Gregory (1996). "A new point mutation in the luteinising hormone receptor gene in familial and sporadic male limited precocious puberty: genotype does not always correlate with phenotype." *J Med Genet* 33(2): 143-7.
- (a) Fan, Q. R. & W. A. Hendrickson (2005). "Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors." *Endocrine* 26(3): 179-88.
- (b) Fan, Q. R. & W. A. Hendrickson (2005). "Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor." *Nature* 433(7023): 269-77.
- Fanelli, F., M. Verhoef-Post, M. Timmerman, A. Zeilemaker, J. W. Martens & A. P. Themmen (2004). "Insight into mutation-induced activation of the luteinizing hormone receptor: molecular simulations predict the functional behavior of engineered mutants at M398." *Mol Endocrinol* 18(6): 1499-508.
- Faure, M., T. A. Voyno-Yasenetskaya & H. R. Bourne (1994). "cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells." *J Biol Chem* 269(11): 7851-4.

- Fernandez, L. M. & D. Puett (1996). "Additions and Corrections to Lys583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling." *J Biol Chem* 271(23): 13925B-13926.
- Fernandez, L. M. & D. Puett (1996). "Identification of amino acid residues in transmembrane helices VI and VII of the lutropin/choriogonadotropin receptor involved in signaling." *Biochemistry* 35(13): 3986-93.
- Ferretti, L. & V. Sgaramella (1981). "Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases." *Nucleic Acids Res* 9(1): 85-93.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin & H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-72.
- Garcia-Campayo, V., A. Jablonka-Shariff & I. Boime (2004). "A single-chain bifunctional gonadotropin analog is secreted from Chinese hamster ovary cells as two distinct bioactive species." *J Biol Chem* 279(43): 44286-93.
- Garcia-Campayo, V., T. R. Kumar & I. Boime (2002). "Thyrotropin, follitropin, and chorionic gonadotropin expressed as a single multifunctional unit reveal remarkable permissiveness in receptor-ligand interactions." *Endocrinology* 143(10): 3773-8.
- Gilchrist, R. L., K. S. Ryu, I. Ji & T. H. Ji (1996). "The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals." *J Biol Chem* 271(32): 19283-7.
- Gilman, A. G. & T. W. Rall (1968). "The role of adenosine 3',5'-phosphate in mediating effects of thyroid-stimulating hormone on carbohydrate metabolism of bovine thyroid slices." *J Biol Chem* 243(22): 5872-81.
- Gromoll, J., U. Eiholzer, E. Nieschlag & M. Simoni (2000). "Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH." *J Clin Endocrinol Metab* 85(6): 2281-6.
- Gromoll, J., C. J. Partsch, M. Simoni, V. Nordhoff, W. G. Sippell, E. Nieschlag & B. B. Saxena (1998). "A mutation in the first transmembrane domain of the lutropin receptor causes male precocious puberty." *J Clin Endocrinol Metab* 83(2): 476-80.

- Gromoll, J., A. Schulz, H. Borta, T. Gudermann, K. J. Teerds, A. Greschniok, E. Nieschlag & F. J. Seif (2002). "Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism." *Eur J Endocrinol* 147(5): 597-608.
- Grüters, A., T. Schöneberg, H. Biebermann, H. Krude, H. P. Krohn, H. Dralle & T. Gudermann (1998). "Severe congenital hyperthyroidism caused by a germ-line neo mutation in the extracellular portion of the thyrotropin receptor." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1431-6.
- (a) Gudermann, T., M. Birnbaumer & L. Birnbaumer (1992). "Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells." *J Biol Chem* 267(7): 4479-88.
- (b) Gudermann, T., C. Nichols, F. O. Levy, M. Birnbaumer & L. Birnbaumer (1992). " $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways." *Mol Endocrinol* 6(2): 272-8.
- Haider, S. G. (2004). "Cell biology of Leydig cells in the testis." *Int Rev Cytol* 233: 181-241.
- Heitman, L. H., J. Oosterom, K. M. Bongers, C. M. Timmers, P. H. Wiegerinck & A. P. Ijzerman (2008). "[ $^3\text{H}$ ]Org 43553, the first low-molecular-weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor." *Mol Pharmacol* 73(2): 518-24.
- Herpin, A., F. Badariotti, F. Rodet & P. Favrel (2004). "Molecular characterization of a new leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor from a bivalve mollusc: evolutionary implications." *Biochim Biophys Acta* 1680(3): 137-44.
- Hirakawa, T., C. Galet & M. Ascoli (2002). "MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR." *Endocrinology* 143(3): 1026-35.
- Hong, S., T. Phang, I. Ji & T. H. Ji (1998). "The amino-terminal region of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor contacts both subunits of human choriogonadotropin. I. Mutational analysis." *J Biol Chem* 273(22): 13835-40.
- Hsu, S. Y., M. Kudo, T. Chen, K. Nakabayashi, A. Bhalla, P. J. van der Spek, M. van Duin & A. J. Hsueh (2000). "The three subfamilies of leucine-rich repeat-

- containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7." *Mol Endocrinol* 14(8): 1257-71.
- Hsu, S. Y., K. Nakabayashi, S. Nishi, J. Kumagai, M. Kudo, O. D. Sherwood & A. J. Hsueh (2002). "Activation of orphan receptors by the hormone relaxin." *Science* 295(5555): 671-4.
- Huhtaniemi, I. T., C. C. Korenbrot & R. B. Jaffe (1977). "HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis." *J Clin Endocrinol Metab* 44(5): 963-7.
- Inoue, H., H. Nojima & H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-8.
- Jaakola, V. P., M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman & R. C. Stevens (2008). "The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist." *Science* 322(5905): 1211-7.
- Jiang, X., M. Dreano, D. R. Buckler, S. Cheng, A. Ythier, H. Wu, W. A. Hendrickson & N. el Tayar (1995). "Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions." *Structure* 3(12): 1341-53.
- Jorand-Lebrun, C., B. Brondyk, J. Lin, S. Magar, R. Murray, A. Reddy, H. Shroff, G. Wands, W. Weiser, Q. Xu, S. McKenna & N. Brugger (2007). "Identification, synthesis, and biological evaluation of novel pyrazoles as low molecular weight luteinizing hormone receptor agonists." *Bioorg Med Chem Lett* 17(7): 2080-5.
- Karges, B., S. Gidenne, C. Aumas, F. Haddad, P. A. Kelly, E. Milgrom & N. de Roux (2005). "Zero-length cross-linking reveals that tight interactions between the extracellular and transmembrane domains of the LH receptor persist during receptor activation." *Mol Endocrinol* 19(8): 2086-98.
- Klebe, G. (2006). "Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations." *Drug Discov Today* 11(13-14): 580-94.
- Kobe, B. & J. Deisenhofer (1993). "Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats." *Nature* 366(6457): 751-6.
- Kobe, B. & J. Deisenhofer (1995). "A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands." *Nature* 374(6518): 183-6.
- Kolakowski, L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." *Receptors Channels* 2(1): 1-7.
- Kossack, N., M. Simoni, A. Richter-Unruh, A. P. Themmen & J. Gromoll (2008). "Mutations in a novel, cryptic exon of the luteinizing hormone/chorionic

- gonadotropin receptor gene cause male pseudohermaphroditism." PLoS Med 5(4): e88.
- Kosugi, S., T. Mori & A. Shenker (1996). "The role of Asp578 in maintaining the inactive conformation of the human lutropin/choriogonadotropin receptor." J Biol Chem 271(50): 31813-7.
- Kosugi, S., C. Van Dop, M. E. Geffner, W. Rabl, J. C. Carel, J. L. Chaussain, T. Mori, J. Merendino, Jr. & A. Shenker (1995). "Characterization of heterogeneous mutations causing constitutive activation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty." Hum Mol Genet 4(2): 183-8.
- Kraaij, R., M. Post, H. Kremer, E. Milgrom, W. Epping, H. G. Brunner, J. A. Grootegeod & A. P. Themmen (1995). "A missense mutation in the second transmembrane segment of the luteinizing hormone receptor causes familial male-limited precocious puberty." J Clin Endocrinol Metab 80(11): 3168-72.
- Kremer, H., R. Kraaij, S. P. Toledo, M. Post, J. B. Fridman, C. Y. Hayashida, M. van Reen, E. Milgrom, H. H. Ropers, E. Mariman, et al. (1995). "Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene." Nat Genet 9(2): 160-4.
- Kremer, H., E. Mariman, B. J. Otten, G. W. Moll, Jr., G. B. Stoelinga, J. M. Wit, M. Jansen, S. L. Drop, B. Faas, H. H. Ropers, et al. (1993). "Cosegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene with familial male-limited precocious puberty." Hum Mol Genet 2(11): 1779-83.
- Kremer, H., J. W. Martens, M. van Reen, M. Verhoef-Post, J. M. Wit, B. J. Otten, S. L. Drop, H. A. Delemarre-van de Waal, M. Pombo-Arias, F. De Luca, N. Potau, J. M. Buckler, M. Jansen, J. S. Parks, H. A. Latif, G. W. Moll, W. Epping, G. Saggese, E. C. Mariman, A. P. Themmen & H. G. Brunner (1999). "A limited repertoire of mutations of the luteinizing hormone (LH) receptor gene in familial and sporadic patients with male LH-independent precocious puberty." J Clin Endocrinol Metab 84(3): 1136-40.
- Kuhn, B. & T. Gudermann (1999). "The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2." Biochemistry 38(38): 12490-8.
- Kumar, R. S. & J. M. Trant (2001). "Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent developments." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129(2-3): 347-55.

- Lapthorn, A. J., D. C. Harris, A. Littlejohn, J. W. Lustbader, R. E. Canfield, K. J. Machin, F. J. Morgan & N. W. Isaacs (1994). "Crystal structure of human chorionic gonadotropin." *Nature* 369(6480): 455-61.
- (a) Latronico, A. C., A. N. Abell, I. J. Arnhold, X. Liu, T. S. Lins, V. N. Brito, A. E. Billerbeck, D. L. Segaloff & B. B. Mendonca (1998). "A unique constitutively activating mutation in third transmembrane helix of luteinizing hormone receptor causes sporadic male gonadotropin-independent precocious puberty." *J Clin Endocrinol Metab* 83(7): 2435-40.
- Latronico, A. C., J. Anasti, I. J. Arnhold, B. B. Mendonca, S. Domenice, M. C. Albano, K. Zachman, B. L. Wajchenberg & C. Tsigos (1995). "A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty." *J Clin Endocrinol Metab* 80(8): 2490-4.
- Latronico, A. C., J. Anasti, I. J. Arnhold, R. Rapaport, B. B. Mendonca, W. Bloise, M. Castro, C. Tsigos & G. P. Chrousos (1996). "Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene." *N Engl J Med* 334(8): 507-12.
- (b) Latronico, A. C., Y. Chai, I. J. Arnhold, X. Liu, B. B. Mendonca & D. L. Segaloff (1998). "A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor." *Mol Endocrinol* 12(3): 442-50.
- (a) Laue, L., W. Y. Chan, A. J. Hsueh, M. Kudo, S. Y. Hsu, S. M. Wu, L. Blomberg & G. B. Cutler, Jr. (1995). "Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 1906-10.
- (b) Laue, L., S. M. Wu, M. Kudo, A. J. Hsueh, G. B. Cutler, Jr., J. E. Griffin, J. D. Wilson, C. Brain, A. C. Berry, D. B. Grant, et al. (1995). "A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia." *Hum Mol Genet* 4(8): 1429-33.
- (a) Laue, L., S. M. Wu, M. Kudo, A. J. Hsueh, G. B. Cutler, Jr., D. H. Jelly, F. B. Diamond & W. Y. Chan (1996). "Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty." *Biochem Mol Med* 58(2): 192-8.

- (b) Laue, L. L., S. M. Wu, M. Kudo, C. J. Bourdony, G. B. Cutler, Jr., A. J. Hsueh & W. Y. Chan (1996). "Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia." *Mol Endocrinol* 10(8): 987-97.
- Laugwitz, K. L., A. Allgeier, S. Offermanns, K. Spicher, J. Van Sande, J. E. Dumont & G. Schultz (1996). "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 116-20.
- Laurent, E., J. Mockel, J. Van Sande, I. Graff & J. E. Dumont (1987). "Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid." *Mol Cell Endocrinol* 52(3): 273-8.
- Leung, M. Y., P. J. Steinbach, D. Bear, V. Baxendale, P. Y. Fechner, O. M. Rennert & W. Y. Chan (2006). "Biological effect of a novel mutation in the third leucine-rich repeat of human luteinizing hormone receptor." *Mol Endocrinol* 20(10): 2493-503.
- Liu, G., L. Duranteau, J. C. Carel, J. Monroe, D. A. Doyle & A. Shenker (1999). "Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor." *N Engl J Med* 341(23): 1731-6.
- Martens, J. W., S. Lumbroso, M. Verhoef-Post, V. Georget, A. Richter-Unruh, M. Szarras-Czapnik, T. E. Romer, H. G. Brunner, A. P. Themmen & C. Sultan (2002). "Mutant luteinizing hormone receptors in a compound heterozygous patient with complete Leydig cell hypoplasia: abnormal processing causes signaling deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2506-13.
- Martens, J. W., M. Verhoef-Post, N. Abelin, M. Ezabella, S. P. Toledo, H. G. Brunner & A. P. Themmen (1998). "A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype." *Mol Endocrinol* 12(6): 775-84.
- Means, A. R. (1974). "Early sequence of biochemical events in the action of follicle stimulating hormone on the testis." *Life Sci* 15(3): 371-89.
- Misrahi, M., G. Meduri, S. Pissard, C. Bouvattier, I. Beau, H. Loosfelt, A. Jolivet, R. Rappaport, E. Milgrom & P. Bougneres (1997). "Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor." *J Clin Endocrinol Metab* 82(7): 2159-65.
- Mizutori, Y., C. R. Chen, S. M. McLachlan & B. Rapoport (2008). "The thyrotropin receptor hinge region is not simply a scaffold for the leucine-rich domain but



- contributes to ligand binding and signal transduction." *Mol Endocrinol* 22(5): 1171-82.
- Moyle, W. R., R. K. Campbell, S. N. Rao, N. G. Ayad, M. P. Bernard, Y. Han & Y. Wang (1995). "Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones." *J Biol Chem* 270(34): 20020-31.
- Moyle, W. R., Y. Xing, W. Lin, D. Cao, R. V. Myers, J. E. Kerrigan & M. P. Bernard (2004). "Model of glycoprotein hormone receptor ligand binding and signaling." *J Biol Chem* 279(43): 44442-59.
- Mueller, S., G. Kleinau, H. Jaeschke, R. Paschke & G. Krause (2008). "Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: Distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation." *J Biol Chem* 283(26): 18048-55.
- Muller, J., B. Gondos, S. Kosugi, T. Mori & A. Shenker (1998). "Severe testotoxicosis phenotype associated with Asp578-->Tyr mutation of the lutrophin/choriogonadotrophin receptor gene." *J Med Genet* 35(4): 340-1.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Nakabayashi, K., M. Kudo, B. Kobilka & A. J. Hsueh (2000). "Activation of the luteinizing hormone receptor following substitution of Ser-277 with selective hydrophobic residues in the ectodomain hinge region." *J Biol Chem* 275(39): 30264-71.
- Narayan, P., J. Gray & D. Puett (2000). "A biologically active single chain human chorionic gonadotropin analog with altered receptor binding properties." *Endocrinology* 141(1): 67-71.
- Nishi, S., K. Nakabayashi, B. Kobilka & A. J. Hsueh (2002). "The ectodomain of the luteinizing hormone receptor interacts with exoloop 2 to constrain the transmembrane region: studies using chimeric human and fly receptors." *J Biol Chem* 277(6): 3958-64.
- Okada, T., M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel & V. Buss (2004). "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure." *J Mol Biol* 342(2): 571-83.

- Osuga, Y., M. Hayashi, M. Kudo, M. Conti, B. Kobilka & A. J. Hsueh (1997). "Co-expression of defective luteinizing hormone receptor fragments partially reconstitutes ligand-induced signal generation." *J Biol Chem* 272(40): 25006-12.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto & M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* 289(5480): 739-45.
- Puett, D., Y. Li, K. Angelova, G. Demars, T. P. Meehan, F. Fanelli & P. Narayan (2005). "Structure-function relationships of the luteinizing hormone receptor." *Ann N Y Acad Sci* 1061: 41-54.
- Qiao, J., B. Han, B. L. Liu, X. Chen, Y. Ru, K. X. Cheng, F. G. Chen, S. X. Zhao, J. Liang, Y. L. Lu, J. F. Tang, Y. X. Wu, W. L. Wu, J. L. Chen, M. D. Chen & H. D. Song (2009). "A splice site mutation combined with a novel missense mutation of LHCGR cause male pseudohermaphroditism." *Hum Mutat* 30(9): E855-65.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis & B. K. Kobilka (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* 450(7168): 383-7.
- Reshef, E., Z. M. Lei, C. V. Rao, D. D. Pridham, N. Chegini & J. L. Luborsky (1990). "The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua." *J Clin Endocrinol Metab* 70(2): 421-30.
- Richards, J. S. (1994). "Hormonal control of gene expression in the ovary." *Endocr Rev* 15(6): 725-51.
- Richter-Unruh, A., E. Korsch, O. Hiort, P. M. Holterhus, A. P. Themmen & S. A. Wudy (2005). "Novel insertion frameshift mutation of the LH receptor gene: problematic clinical distinction of Leydig cell hypoplasia from enzyme defects primarily affecting testosterone biosynthesis." *Eur J Endocrinol* 152(2): 255-9.
- Richter-Unruh, A., J. W. Martens, M. Verhoef-Post, H. T. Wessels, W. A. Kors, G. H. Sinnecker, A. Boehmer, S. L. Drop, S. P. Toledo, H. G. Brunner & A. P. Themmen (2002). "Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene." *Clin Endocrinol (Oxf)* 56(1): 103-12.
- Richter-Unruh, A., M. Verhoef-Post, S. Malak, J. Homoki, B. P. Hauffa & A. P. Themmen (2004). "Leydig cell hypoplasia: absent luteinizing hormone receptor

- cell surface expression caused by a novel homozygous mutation in the extracellular domain." *J Clin Endocrinol Metab* 89(10): 5161-7.
- Rommerts, F. F. & A. O. Brinkman (1981). "Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells." *Mol Cell Endocrinol* 21(1): 15-28.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen & B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* 459(7245): 356-63.
- Ryu, K. S., R. L. Gilchrist, I. Ji, S. J. Kim & T. H. Ji (1996). "Exoloop 3 of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor. Lys583 is essential and irreplaceable for human choriogonadotropin (hCG)-dependent receptor activation but not for high affinity hCG binding." *J Biol Chem* 271(13): 7301-4.
- Salomon, Y., C. Londos & M. Rodbell (1974). "A highly sensitive adenylate cyclase assay." *Anal Biochem* 58(2): 541-8.
- Sangkuhl, K., A. Schulz, G. Schultz & T. Schöneberg (2002). "Structural requirements for mutational lutropin/choriogonadotropin receptor activation." *J Biol Chem* 277(49): 47748-55.
- Schneider, G. & U. Fechner (2005). "Computer-based de novo design of drug-like molecules." *Nat Rev Drug Discov* 4(8): 649-63.
- Schubert, R. L., P. Narayan & D. Puett (2003). "Specificity of cognate ligand-receptor interactions: fusion proteins of human chorionic gonadotropin and the heptahelical receptors for human luteinizing hormone, thyroid-stimulating hormone, and follicle-stimulating hormone." *Endocrinology* 144(1): 129-37.
- Schulz, A., T. Schöneberg, R. Paschke, G. Schultz & T. Gudermann (1999). "Role of the third intracellular loop for the activation of gonadotropin receptors." *Mol Endocrinol* 13(2): 181-90.
- Schwartz, T. W., T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde & C. E. Elling (2006). "Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 481-519.
- Schweizer, R., G. Blumenstock, K. Mangelsdorf, S. Ehehalt, L. Rossner, T. Dorn, G. Binder & M. B. Ranke (2010). "Prevalence and incidence of endocrine disorders in children: results of a survey in Baden-Wuerttemberg and Bavaria (EndoPrIn BB) 2000-2001." *Klin Padiatr* 222(2): 67-72.
- Serrano-Vega, M. J., F. Magnani, Y. Shibata & C. G. Tate (2008). "Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(3): 877-82.

- Shenker, A., L. Laue, S. Kosugi, J. J. Merendino, Jr., T. Minegishi & G. B. Cutler, Jr. (1993). "A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty." *Nature* 365(6447): 652-4.
- Stavrou, S. S., Y. S. Zhu, L. Q. Cai, M. D. Katz, C. Herrera, M. Defillo-Ricart & J. Imperato-McGinley (1998). "A novel mutation of the human luteinizing hormone receptor in 46XY and 46XX sisters." *J Clin Endocrinol Metab* 83(6): 2091-8.
- Sugahara, T., M. R. Pixley, S. Minami, E. Perlas, D. Ben-Menahem, A. J. Hsueh & I. Boime (1995). "Biosynthesis of a biologically active single peptide chain containing the human common alpha and chorionic gonadotropin beta subunits in tandem." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 2041-5.
- Themmen, A. P., J. W. Martens & H. G. Brunner (1998). "Activating and inactivating mutations in LH receptors." *Mol Cell Endocrinol* 145(1-2): 137-42.
- Themmen, A. P. N. & I. T. Huhtaniemi (2000). "Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function." *Endocr Rev* 21(5): 551-83.
- Thomas, D., T. G. Rozell, X. Liu & D. L. Segaloff (1996). "Mutational analyses of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine-rich repeats 1-6 are involved in hormone binding." *Mol Endocrinol* 10(6): 760-8.
- Toledo, S. P., H. G. Brunner, R. Kraaij, M. Post, P. L. Dahia, C. Y. Hayashida & H. T. A. P. Kremer (1996). "An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female." *J Clin Endocrinol Metab* 81(11): 3850-4.
- van de Lagemaat, R., C. M. Timmers, J. Kelder, C. van Koppen, S. Mosselman & R. G. Hanssen (2009). "Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor." *Hum Reprod* 24(3): 640-8.
- van Koppen, C. J., G. J. Zaman, C. M. Timmers, J. Kelder, S. Mosselman, R. van de Lagemaat, M. J. Smit & R. G. Hanssen (2008). "A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378(5): 503-14.
- Van Sande, J., C. Massart, S. Costagliola, A. Allgeier, F. Cetani, G. Vassart & J. E. Dumont (1996). "Specific activation of the thyrotropin receptor by trypsin." *Mol Cell Endocrinol* 119(2): 161-8.
- van Straten, N. C., G. G. Schoonus-Gerritsma, R. G. van Someren, J. Draaijer, A. E. Adang, C. M. Timmers, R. G. Hanssen & C. A. van Boeckel (2002). "The first

- orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction." *Chembiochem* 3(10): 1023-6.
- Vassart, G., L. Pardo & S. Costagliola (2004). "A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors." *Trends Biochem Sci* 29(3): 119-26.
- Vlaeminck-Guillem, V., S. C. Ho, P. Rodien, G. Vassart & S. Costagliola (2002). "Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist." *Mol Endocrinol* 16(4): 736-46.
- Webber, K. M., G. Casadesus, M. W. Marlatt, G. Perry, C. R. Hamlin, C. S. Atwood, R. L. Bowen & M. A. Smith (2005). "Estrogen bows to a new master: the role of gonadotropins in Alzheimer pathogenesis." *Ann N Y Acad Sci* 1052: 201-9.
- Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." *Faseb J* 11(5): 346-54.
- Wu, S. M., K. M. Hallermeier, L. Laue, C. Brain, A. C. Berry, D. B. Grant, J. E. Griffin, J. D. Wilson, G. B. Cutler, Jr. & W. Y. Chan (1998). "Inactivation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia." *Mol Endocrinol* 12(11): 1651-60.
- Wu, S. M., E. W. Leschek, C. Brain & W. Y. Chan (1999). "A novel luteinizing hormone receptor mutation in a patient with familial male-limited precocious puberty: effect of the size of a critical amino acid on receptor activity." *Mol Genet Metab* 66(1): 68-73.
- Yano, K., A. Hidaka, et al. (1994). "A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene as familial cases." *J Clin Endocrinol Metab* 79(6): 1818-23.
- Yano, K., L. D. Kohn, M. Saji, N. Kataoka, A. Okuno & G. B. Cutler, Jr. (1996). "A case of male-limited precocious puberty caused by a point mutation in the second transmembrane domain of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor gene." *Biochem Biophys Res Commun* 220(3): 1036-42.
- Yano, K., M. Saji, A. Hidaka, N. Moriya, A. Okuno, L. D. Kohn & G. B. Cutler, Jr. (1995). "A new constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene in cases of male-limited precocious puberty." *J Clin Endocrinol Metab* 80(4): 1162-8.

- 
- Zeng, H., T. Phang, Y. S. Song, I. Ji & T. H. Ji (2001). "The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor in hormone interaction and signal generation." *J Biol Chem* 276(5): 3451-8.
- Zenteno, J. C., P. Canto, S. Kofman-Alfaro & J. P. Mendez (1999). "Evidence for genetic heterogeneity in male pseudohermaphroditism due to Leydig cell hypoplasia." *J Clin Endocrinol Metab* 84(10): 3803-6.
- Zhang, M., D. Mizrachi, F. Fanelli & D. L. Segaloff (2005). "The Formation of a Salt Bridge Between Helices 3 and 6 Is Responsible for the Constitutive Activity and Lack of Hormone Responsiveness of the Naturally Occurring L457R Mutation of the Human Lutropin Receptor." *J Biol Chem* 280(28): 26169-76.
- Zhang, M., K. P. Tong, V. Fremont, J. Chen, P. Narayan, D. Puett, B. D. Weintraub & M. W. Szkudlinski (2000). "The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design." *Endocrinology* 141(9): 3514-7.
- Zhang, M. L., H. Sugawa, S. Kosugi & T. Mori (1995). "Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion of the extracellular domain." *Biochem Biophys Res Commun* 211(1): 205-10.
- Zhang, R., E. Buczko & M. L. Dufau (1996). "Requirement of cysteine residues in exons 1-6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding." *J Biol Chem* 271(10): 5755-60.

## 11 Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. Gudermann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die es mir ermöglichte, mich mit einem spannenden molekularbiologischen Thema zu beschäftigen.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bünemann für die Übernahme meiner thematischen Fragestellung bedanken. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Krasel für seine Expertenmeinung zu meiner Arbeit danken.

Überaus dankbar bin ich Herrn Dr. Andreas Breit für die anregenden Diskussionen im Rahmen der Doktorarbeit und die konstruktive Kritik zu meinem Manuskript. Ich hoffe, dass ich seine Ratschläge umsetzen konnte und der Leser meinem Gedankengang leicht folgen kann.

Ein großer Dank gilt auch der German-Israeli Foundation (GIF) für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Des Weiteren sei all denen gedankt, die nicht namentlich Erwähnung finden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zum Schluss möchte ich meiner Mutter danken, die mich zu jeder Zeit während meines Studiums und der Doktorarbeit unterstützt hat.

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Pascal Nurwakagari
Anschrift:	Im Kohlruß 4 65835 Liederbach am Taunus
geboren:	17.11.1973 in Neuss
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Schulausbildung:

1980 – 1984	Theodor-Fließner-Grundschule, Neuss
1984 – 1993	Marie-Curie-Gymnasium, Neuss

### Studium und wissenschaftliche Tätigkeit:

10/1995 – 10/2000	Studium der Pharmazie
25.10.2000	2. Staatsexamen – Pharmazie
11/2000 – 04/2001	Pharmaziepraktikum in der Eichwald-Apotheke, Frankfurt am Main
05/2001 – 10/2001	Pharmaziepraktikum bei 3M Medica, Borken (Westfalen), Schwerpunkt: Plasmaspiegelbestimmung von Arzneistoffen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie
12.12.2001	Abschluss des dritten Abschnittes der pharmazeutischen Ausbildung
13.02.2002	Approbation als Apotheker



---

02/2002 – 11/2006 naturwissenschaftlicher Doktorand im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität, Marburg  
Titel: „Die Rolle der Extrazellulärdomäne beim agonistenabhängigen und agonistenunabhängigen Aktivierungsprozess des LH-Rezeptors“

**Weitere Tätigkeiten:**

08/1993 – 10/1994 Zivildienst im Labor des Lukaskrankenhauses, Neuss  
Tätigkeit: labordiagnostische Untersuchungen von Blut und Urin

12/1997 – 10/2000 Studentische Aushilfskraft bei der ZENECA Agro GmbH, Frankfurt am Main  
Tätigkeiten:  

- Statistische Auswertung von Versuchsdaten
- Sammeln und Zusammenfassen von Unterlagen zur Einreichung bei der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig zwecks Antrag auf Zulassung von Pflanzenschutzmitteln

10/2002 – 02/2006 Referent von studentischen Lehrveranstaltungen des Faches „Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie“ für Humanmedizinstudenten des 6. Fachsemesters

10/2002 – 02/2006 Betreuung von Laborpraktika für Studenten der Fachrichtungen Humanbiologie und Chemie im Fach „Pharmakologie und Toxikologie“

11/2006 – 10/2008 Clinical Research Associate, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

seit 11/2008 Medical Advisor, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

## 13 Publikationen und Vorträge

### 13.1 Publikationen

Gudermann, T., Nurwakagari, P. & Ben-Menahem, D. (2005). Hormone binding to the follicle-stimulating hormone receptor--crystal clear! *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:245–247.

Nurwakagari, P., Breit, A., Hess, C., Salma-Livny, H., Ben-Menahem, D. & Gudermann, T. (2007). A conformational contribution of the luteinizing hormone receptor ectodomain to receptor activation. *Journal of Molecular Endocrinology* 38:259–275.

Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M. & Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* 27:3092–3103.

### 13.2 Vorträge

Nurwakagari, P., Hess, C., Ben-Menahem, D. & Gudermann, T. (2004). The role of the glycoprotein hormone receptor ectodomain for agonist-induced activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 Suppl 1:R67.

Nurwakagari, P., Breit, A., Hess, C., Ben-Menahem, D. & Gudermann, T. (2005). Contribution of the extracellular domain to agonist-induced and constitutive LHR receptor activation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113 Suppl 1:V2 21.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, M., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M. & Gudermann, T. (2006). The role of G-protein-coupled receptors for TRPC-channel dependent myogenic tone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 Suppl 7:61–61.

## 14 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle der Extrazellulärdomäne beim agonistenabhängigen und agonistenunabhängigen Aktivierungsprozess des LH-Rezeptors“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den \_\_\_\_\_

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift